

**Biochemische Charakterisierung**  
**der Phytochrome aus**  
*Pseudomonas aeruginosa* und  
*Aspergillus nidulans*

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Ronja Tasler

aus Braunfels

1. Referent: PD Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel

2. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 12.12.05

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.02.2006

Druckjahr: 2006

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereiches für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Wegele, R., Tasler, R., Zeng, Y., Rivera, M. & Frankenberg-Dinkel, N. (2004) The hemeoxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 279, 45791-45802.

Tasler, R., Moises, T. & Frankenberg-Dinkel, N. (2005) Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J.* 272, 1927-1936.

Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. & Fischer, R. (2005) The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol.* 15, 1-6.

### **Tagungsbeiträge**

Tasler, R., Frankenberg-Dinkel, N. (Poster). Functional Characterization of the bacterial phytochrome in *Pseudomonas aeruginosa*. VAAM-Jahrestagung, Braunschweig (2004).

Wegele, R., Tasler, R., Frankenberg-Dinkel, N. (Poster). Two hemeoxygenases in *Pseudomonas aeruginosa* with distinct functions. VAAM-Jahrestagung, Braunschweig (2004).

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Phytochrom</b>	<b>5</b>
2.1.1 Domänenstruktur der Phytochrome	6
2.1.2 Pflanzliche Phytochrome (Phy)	9
2.1.3 Cyanobakterielle Phytochrome (Cphs)	11
2.1.3.1 Klassische cyanobakterielle Phytochrome	11
2.1.3.2 Weitere cyanobakterielle Phytochrome	12
2.1.3.3 Phytochrom-ähnliche Proteine in Cyanobakterien	13
2.1.4 Bakterielle Phytochrome (Bphs)	14
2.1.4.1 Das bakterielle Phytochrom aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.1.5 Phytochrome aus Pilzen (Fphs)	16
2.1.5.1 Das Phytochrom aus <i>Aspergillus nidulans</i>	16
2.1.6 Evolution	17
<b>2.2 Tetrapyrrole</b>	<b>19</b>
2.2.1 Lineare Tetrapyrrole	20
2.2.1.1 Die vier Biliverdinisomere	20
2.2.1.2 Biosynthese der Phytobiline	21
<b>2.3 Hämoxygenasen</b>	<b>22</b>
2.3.1 Hämoxygenasen in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
<b>2.4 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Geräte und Chemikalien</b>	<b>26</b>
3.1.1 Geräte	26
3.1.2 Chemikalien, Enzyme und Kits	27
<b>3.2 Bakterienstämme und Plasmide</b>	<b>27</b>
3.2.1 Bakterienstämme	27
3.2.2 Plasmide	28

<b>3.3 Medien und Medienzusätze</b>	<b>29</b>
3.3.1 Medien	29
3.3.2 Medienzusätze	29
<b>3.4 Mikrobiologische Techniken</b>	<b>29</b>
3.4.1 Sterilisation	29
3.4.2 Bakterienkultivierung	29
3.4.3 Bestimmung von Zelldichten	30
3.4.4 Lagerung von Bakterienstämmen	30
<b>3.5 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>30</b>
3.5.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	30
3.5.1.1 Lösungen für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen	31
3.5.2 Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	31
3.5.2.1 Lösungen für die Transformation chemisch-kompetenter Zellen	31
3.5.3 Präparation von Plasmid-DNA	32
3.5.3.1 Lösungen für die Plasmidpräparation	32
3.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
3.5.5 Agarosegelelektrophorese	33
3.5.5.1 Lösungen für Agarosegelelektrophorese	33
3.5.6 Reinigung von DNA-Fragmenten	33
3.5.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	34
3.5.8 Dephosphorylierung von DNA	34
3.5.9 Ligation von DNA	34
3.5.10 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
3.5.10.1 Verwendete Primer	35
3.5.11 Gerichtete Mutagenese	35
3.5.12 Sequenzierung	36
<b>3.6 Proteinproduktion</b>	<b>37</b>
3.6.1 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Phytochroms	37
3.6.1.1 Bakterienkultivierung	37
3.6.1.2 Zellaufschluß	38
3.6.1.3 Ammoniumsulfatfällung	38
3.6.1.4 Affinitätschromatographie	38
3.6.1.5 Anionenaustauschchromatographie	39
3.6.2 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung des <i>Aspergillus nidulans</i> Phytochroms	39
3.6.2.1 Bakterienkultivierung	39
3.6.2.2 Zellaufschluß	39

3.6.2.3 Affinitätschromatographie	39
3.6.2.4 Gelpermeationchromatographie	39
3.6.3 Lösungen für die Produktion und Reinigung	40
3.6.4 Dialyse	40
3.6.5 Proteinkonzentrierung	41
<b>3.7 Proteincharakterisierung</b>	<b>41</b>
3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.7.1.1 Lösungen für die SDS-PAGE	42
3.7.2 Western-Blot	43
3.7.3.1 Nachweis von immobilisierten Proteinen mittels Antikörpern	43
3.7.3.2 Lösungen für die Durchführung von Western-Blots	43
3.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	44
3.7.5 Analytische Gelpermeationschromatographie (GPC)	45
3.7.6 Phytochrom - Assemblierungsexperimente	45
3.7.6.1 Differenzspektroskopie	45
3.7.6.2 Langzeitexperimente	45
3.7.6.3 Zink-induzierte rote Fluoreszenz	46
3.7.6.4 Bestimmung eines Affinitätskoeffizienten	46
3.7.6.5 Assemblierungsexperimente nach chemischer Modifikation des Phytochroms	46
3.7.7 Biliverdinreduktasetest	46
3.7.7.1 Lösungen für Biliverdinreduktasetest	47
3.7.8 Proteinkinasetest	47
3.7.8.1 Lösungen für den Proteinkinasetest	47
3.7.9 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD)	48
3.7.10 Fluoreszenzspektroskopie	48
3.7.11 Synthese von 15,16-Dihydrobiliverdin (DHBV)	48
3.7.11.1 Lösungen für gekoppelten Enzymtest	49
3.7.12 HPLC-Analyse	50
<b>3.8 Chemische Synthese der vier Biliverdinisomere</b>	<b>50</b>
3.8.1 HPLC-Analyse	51
<b>3.9 Bioinformatische Methoden</b>	<b>51</b>
<b>4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Rekombinante Produktion und Reinigung von BphP aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b>52</b>
<b>4.2 Rekombinante Produktion und Reinigung von FphA aus <i>Aspergillus nidulans</i></b>	<b>53</b>
<b>4.3 Analytische Gelpermeationschromatographie (GPC)</b>	<b>54</b>

<b>4.4 Assemblierung und Chromophorbindung</b>	<b>55</b>
<b>4.5 Chromophor-Protein-Interaktion</b>	<b>59</b>
<b>4.6 Charakterisierung der Chromophor-Bindestelle</b>	<b>61</b>
4.6.1 Modifizierung mit Iodacetamid	62
4.6.2 Differenzspektroskopie und Zink-induzierte rote Fluoreszenz verschiedener Phytochrom-Varianten	63
4.6.3 Biliverdinreduktasetest	65
4.6.4 Bestimmung eines Affinitätskoeffizienten ( $K_{\text{a}}$ )	66
4.6.5 Chromophorbindestelle	67
<b>4.7 Dreidimensionale Struktur der Chromophor-bindenden Domäne des <i>D. radiodurans</i> Phytochroms</b>	<b>68</b>
<b>4.8 Photoisomerisierung von <i>PaBphP</i></b>	<b>71</b>
<b>4.9 Autophosphorylierung</b>	<b>73</b>
<b>4.10 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD)</b>	<b>75</b>
<b>4.11 Interaktion zwischen <i>PaBphP</i> und Hämoxxygenase:Biliverdin-Komplexen</b>	<b>77</b>
4.11.1 Synthese der vier Biliverdinisomere BV IX $\alpha$ , IX $\beta$ , IX $\delta$ und IX $\gamma$	78
4.11.2 Interaktion zwischen BphP und BphO:BV bzw. PigA:BV	78
<b>4.12 Funktion</b>	<b>81</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>83</b>
<b>6 SUMMARY</b>	<b>85</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>87</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>97</b>
Publikationen	
Danksagung	

# 1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Agp	Phytochrom aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BLD	Bilinlyasedomäne
BSA	Rinderserumalbumin, „ <i>bovin serum albumin</i> “
Bph	bakterielles Phytochrom
BR	Bilirubin
BV	Biliverdin
BVR	Biliverdinreduktase
bzw.	beziehungsweise
°C	grad Celsius
CBD	Chromophor-bindende Domäne
CCA	komplementäre chromatische Adaptation
CD	Circulardichroismus-Spektroskopie
cGMP	cyclisches Guanosinmomonophosphat
Cph	cyanobakterielles Phytochrom
Cys	Cystein
DHBV	15,16-Dihydrobiliverdin
d.h.	das heisst
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DrBphP	Phytochrom aus <i>Deinococcus radiodurans</i>
DrCBD	Chromophor-bindende Domäne des Phytochroms aus <i>Deinococcus radiodurans</i>
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleotid
ds	doppelsträngig
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient



EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FhlA	bakterieller Formiathydrogenlyase-Transkriptionsaktivator
FNR	Ferredoxin:NADP <sup>+</sup> :Oxidoreduktase
FphA	Phytochrom aus <i>Aspergillus nidulans</i>
FR	Dunkelrotlicht
Fur	Eisen-Aufnahme-Regulator, „ <i>ferric uptake regulator</i> “
GAF	Domäne, welche zuerst beschrieben wurde in cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen aus Vertebraten, cyanobakteriellen <u>A</u> denylatcyclasen und dem bakteriellen <u>F</u> ormiathydrogenlyase-Transkriptionsaktivator FhlA
Glc-6-P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HABA	4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxysäure
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HKD	Histidinkinasedomäne
HO	Hämoxygenase
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie („ <i>high performance liquid chromatography</i> “)
HY2	Ferredoxin-abhängige Phytochromobilin-Synthase
IAA	Iodacetamid
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
LB	Luria Bertani (Medium)
M	Molar
Mb	Megabasen
MBq	Megabequerel
mg	milligramm
min	Minute
MOPS	(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Mr	relative molekulare Masse
μM	μMolar

NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduziert)
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
ng	nanogramm
OD	Optische Dichte
orf	offenes Leseraster, „ <i>open reading frame</i> “
<i>PaBphP</i>	Phytochrom aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	PER, ARNT, SIM Wiederholungen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, „ <i>phosphate buffered saline</i> “
PCB	Phycocyanobilin
PCR	Polymerasekettenreaktion, „ <i>polymerase chain reaction</i> “
PEB	Phycoerythrobilin
PebA	15,16-Dihydrobiliverdin:Ferredoxin Oxidoreduktase
PebB	3Z-Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase
Pfr	dunkelrotlicht-absorbierende Form des Phytochroms
PcyA	3Z-Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase
PΦB	Phytochromobilin
Phy	Phytochrom
PHY	Phytochromdomäne
Pr	hellrotlicht-absorbierende Form des Phytochroms
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	hellrotes Licht
RBS	Ribosomenbindestelle
rpm	Umdrehungen pro Minute, „ <i>rounds per minute</i> “
RR	Antwortregulator, „ <i>response regulator</i> “
RRD	Antwortregulator-Domäne
RT	Raumtemperatur
SAP	alkalische Phosphatase aus Garnelen, „ <i>shrimp alkaline phosphatase</i> “
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA

TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen, „ <i>volume per volume</i> “
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen, „ <i>weight per volume</i> “
z.B.	zum Beispiel

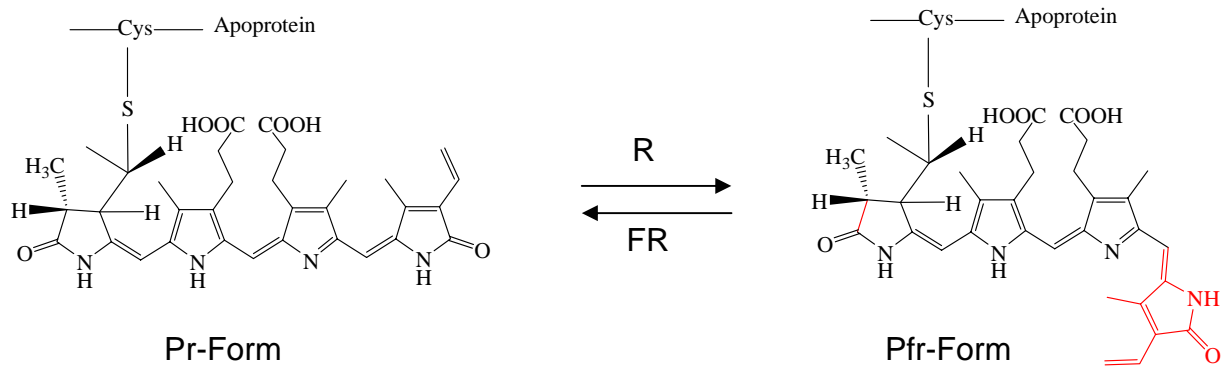
## 2 Einleitung

### 2.1 Phytochrom

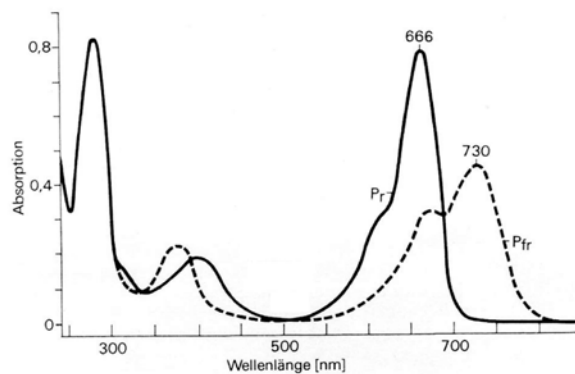
Phytochrome sind Photorezeptoren in Pflanzen und wurden schon vor über 40 Jahren beschrieben (Butler *et al.*, 1959). Erste Hinweise auf ein Photorezeptor-System mit speziellen Eigenschaften waren schon 1920 in der Arbeit von Garner *et al.* zu finden, in der die Induktion der Blütenbildung und Detektion der Photoperiode in Pflanzen untersucht wurden (Garner & Allard, 1920). Später wurden Phytochrome auch in niedrigen Pflanzen wie Moosen oder Farnen und in Algen (Kolukisaoglu *et al.*, 1995; Lagarias *et al.*, 1995) entdeckt, aber auch in Cyanobakterien, einigen nicht-photosynthetischen heterotrophen Bakterien und einigen Pilzen. In Pflanzen sind Phytochrome an Prozessen wie Samenkeimung, Deetiolierung, Erkennung und Vermeidung der Chlorophyllbeschattung durch Nachbarpflanzen und der Blüteninduktion beteiligt. Sie nehmen Lichtqualität, -quantität und Richtung wahr und ermöglichen es Pflanzen so, optimal auf sich ändernde Lichtverhältnisse zu reagieren.

Phytochrome sind homodimere Proteine. Sie bestehen aus einem großen Apoprotein, an das ein lineares Tetrapyrrol (Bilin) als prosthetische Gruppe kovalent gebunden ist. Die Knüpfung dieser Bindung erfolgt in einer autokatalytischen Reaktion (Terry *et al.*, 1993). Der gebundene Chromophor (Bilin) ermöglicht die Wahrnehmung von hellrotem (R) bzw. dunkelrotem (FR) Licht. Phytochrome existieren somit in zwei relativ stabilen Formen: der rotlichtabsorbierenden Pr-Form und der dunkelrotlichtabsorbierenden Pfr-Form, welche durch Einstrahlung von Licht geeigneter Wellenlänge ineinander umgewandelt werden können. Dies ist auf eine 15Z/15E-Isomerisierung zwischen den Pyrrolringen C und D des Chromophors zurückzuführen (Abb.1A), welche auch eine Konformationsänderung im Protein zur Folge hat. Die beiden Formen lassen sich spektral voneinander unterscheiden (Abb. 1B). Aufgrund der überlappenden Absorptionsspektren der Pr- und Pfr-Form führt die Photokonversion unter Bestrahlung mit hellrotem Licht immer zur Bildung eines Gleichgewichts zwischen beiden Formen (Abb. 1B). Rotes Licht führt in Phytochrom (PhyA) aus Hafer oder Reis zu einer Mischung aus 87 % Pfr- und 13 % Pr-Form (Kelly & Lagarias, 1985; Lagarias *et al.*, 1987). Das Pr-Spektrum weist keine Absorption in der Dunkelrotlichtregion auf und so kann dunkelrotes Licht Phytochrom zu 99 % in die Pr-Form umwandeln (Mancinelli, 1986).

(A)



(B)



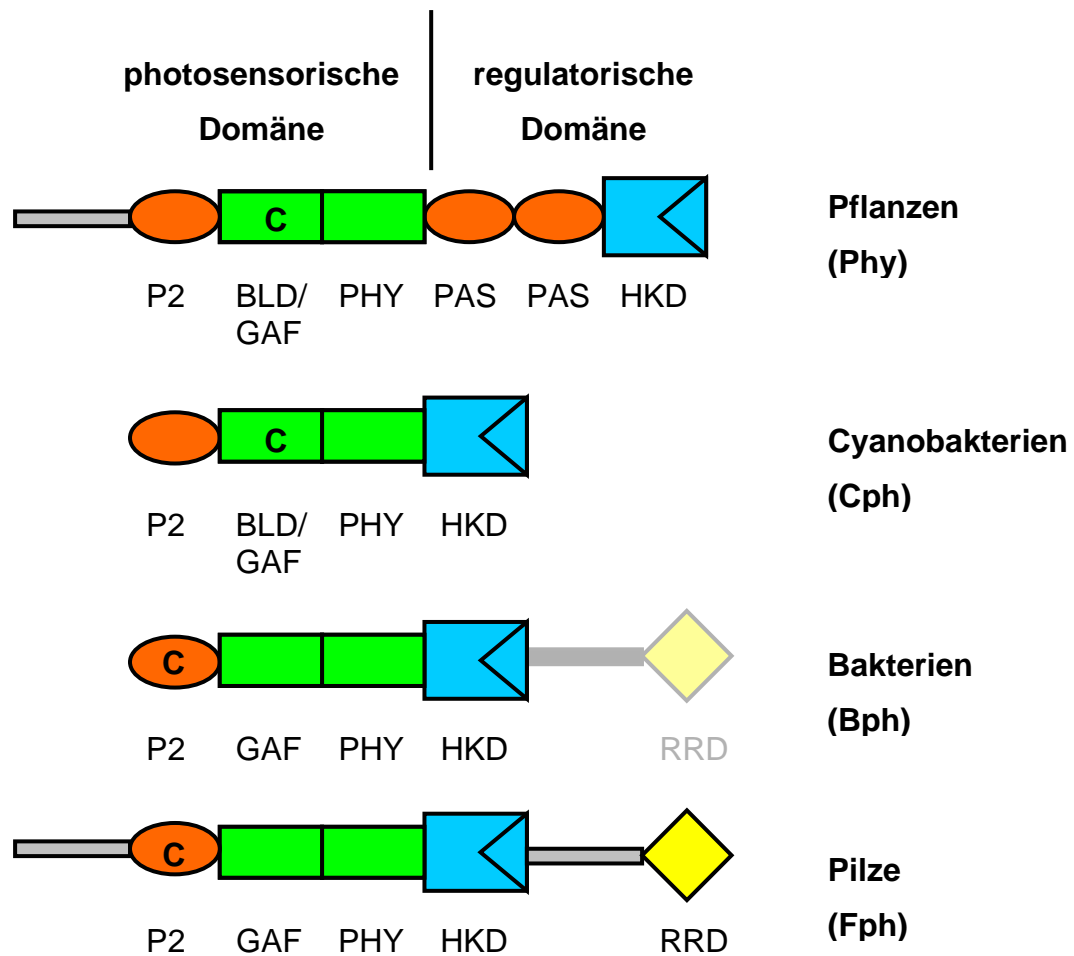
**Abbildung 1:** (A) Pr- und Pfr-Form. (B) Pr- und Pfr-Absorptionsspektren von extrahiertem Phytochrom aus Hafer.

Der Photorezeptor Phytochrom ist ein molekularer lichtregulierter Schalter, der auf Hellrot- bzw. Dunkelrotlicht reagiert, wobei die eine Form die „aktive“, die andere die „inaktive“ Form darstellt.

### 2.1.1 Domänenstruktur der Phytochrome

Phytochrome sind große Chromoproteine und bestehen aus zwei Hauptdomänen, einer N-terminalen photosensorischen Domäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne. In Abbildung 2 ist die Domänenstruktur der verschiedenen Phytochromklassen, d.h. pflanzlicher (Phy), cyanobakterieller (Cphs), bakterieller (Bphs) und pilzlicher (Fphs) Phytochrome dargestellt.

Phytochrome bestehen aus verschiedenen Subdomänen, welche im Folgenden genauer beschrieben werden.



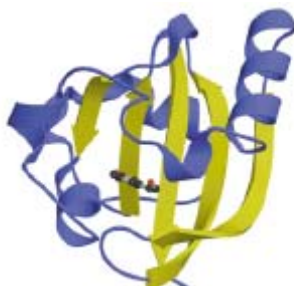
**Abbildung 2:** Domänenstruktur pflanzlicher (Phy), cyanobakterieller (Cphs), bakterieller (Bphs) und pilzlicher (Fphs) Phytochrome. BLD, Bilinlyasedomäne; GAF, GAF-Domäne; PHY, Phytochromdomäne; PAS, PER, ARNT, SIM Wiederholungen; HKD, Histidinkinasedomäne; RRD, Antwortregulatorodomäne.

Die Bilinlyasedomäne (BLD) wird auch als P3-Domäne bezeichnet und gehört zur Familie der GAF-Domänen (Pfam Datenbank: <http://pfam.wustl.edu>). Sie wird als minimale GAF-Domäne definiert, welche in der Lage ist, lineare Tetrapyrrole autokatalytisch zu binden.

GAF-Domänen sind kleine Liganden-bindende Domänen und wurden erstmals für cGMP-spezifische Phosphodiesterasen aus Vertebraten, cyanobakteriellen Adenylatcyclasen und dem bakteriellen Formiathydrogenlyase-Transkriptionsaktivator FhlA beschrieben (Aravind & Ponting, 1997). Sie bestehen aus einer konservierten Region von ca. 150 Aminosäuren, welche in vielen Signalmolekülen vorkommt. In einigen Fällen beinhalten GAF-Domänen eine Bindestelle für zyklische Nukleotide, wobei die hochkonservierte Tetrapyrrol-bindende Domäne in pflanzlichen Phytochromen eine Bilinlyase-spezifische Unterfamilie bildet (Ho *et al.*, 2000). GAF-Domänen kommen typischerweise in multidomänen Proteinen vor, die an Signalprozessen beteiligt sind, und sind häufig in Verbindung mit PAS-Domänen zu finden.

Sie können aber auch alleine auftreten wie z.B. in dem Hefeprotein YLK9 unbekannter Funktion (Ho *et al.*, 2000).

PAS-Domänen wurden erstmals in einer Familie eukaryotischer Proteine identifiziert, welche die Transkription regulieren. Beispiele sind das „*periodic clock*“-Protein (PER) aus *Drosophila melanogaster*, der „*aromatic hydrocarbon receptor translocator*“ (ARNT) aus Vertebraten und „*single minded*“ (SIM) aus *D. melanogaster* (Ponting & Aravind, 1997). PAS-Domänen sind ca. 100-120 Aminosäuren lang und haben strukturelle Ähnlichkeit mit den GAF-Domänen. Sie binden kleine Moleküle wie Flavine, Häme und planare aromatische Verbindungen, die als prosthetische Gruppen der Wahrnehmung von Licht, Sauerstoff und des Redoxzustands dienen (Taylor & Zhulin, 1999). PAS-Domänen spielen eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen, welche durch die Struktur des gebundenen Liganden reguliert werden. Obwohl die Aminosäuresequenzen verschiedener PAS-Domänen nur wenig Similarität aufweisen, scheint die dreidimensionale Struktur konserviert zu sein. Die Strukturen aller bisher charakterisierten PAS-Domänen ähneln der Struktur des „*photoactive yellow proteins*“ (PYP) (Abb. 3) (Pellequer *et al.*, 1998), einem Photorezeptor, der an der photoaktiven Antwort im Bakterium *Ectothiorhodospira halophila* beteiligt ist (Sprenger *et al.*, 1993). Die Struktur zeigt einen typischen „ $\alpha/\beta$ -PAS-fold“ aus einem fünfsträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, welches von  $\alpha$ -Helices flankiert wird. Diese Anordnung des  $\beta$ -Faltblatts bildet das Gerüst, an den der Chromophor p-Cumarsäure über eine Thioetherbindung kovalent verknüpft wird (Borgstahl *et al.*, 1995).



**Abbildung 3:** Kristallstruktur des „*photoactive yellow protein*“ aus *Ectothiorhodospira halophila* (PYP). Die Struktur zeigt eine typische PAS-Struktur mit einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt (gelb), welches von  $\alpha$ -Helices (blau) flankiert ist.

Die Histidinkinasedomäne (HKD) der Phytochrome ähnelt Histidinkinasen aus bakteriellen Zwei-Komponentensystemen, welche aus einem Sensorprotein und einem dazugehörigen Antwortregulator (RR) bestehen. Nach Erhalt eines Signals im Sensorprotein kommt es zur Autophosphorylierung der HKD an einem konservierten Histidinrest. Anschließend wird die Phosphatgruppe in der Regel auf einen Aspartatrest des dazugehörigen RR transferiert. In sogenannten Hybridkinasen kann der RR auch direkt mit der HKD verbunden sein. Der phosphorylierte RR überträgt dann wiederum ein Signal zu einem Effektor oder kann selbst ein Transkriptionsfaktor sein.

Die photosensorische Domäne (ca. 500 – 600 Aminosäuren lang) ist hochkonserviert und besteht aus verschiedenen Subdomänen. In pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytochromen ist ein konservierter Cysteinrest in der BLD vorhanden, welcher den Chromophor (Bilin) über eine Thioetherbindung kovalent bindet (Lagarias & Rapoport, 1980). Dieser Cysteinrest fehlt in bakteriellen und pilzlichen Phytochromen und ist durch eine hydrophobe Aminosäure wie z.B. Isoleucin ersetzt. Man findet einen konservierten Cysteinrest in der P2-Domäne und es konnte z.B. für das Phytochrom aus *Agrobacterium tumefaciens* gezeigt werden, dass dieses Cystein die Bindestelle für den Chromophor darstellt (Lamparter *et al.*, 2002; Lamparter, 2004). In den meisten Phytochromen ist der GAF-Domäne eine P2-Domäne vorangestellt, die oft als PAS-Domäne beschrieben ist. In allen pflanzlichen und bakteriellen Phytochromen, aber auch in pilzlichen Phytochromen wie aus *Aspergillus nidulans* oder *Cryptococcus neoformans* folgt der GAF-Domäne eine Phytochrom-Domäne (PHY), welche einer GAF-Domäne sehr ähnelt.

Die C-terminale regulatorische Domäne ist weniger konserviert. Pflanzliche Phytochrome enthalten im Gegensatz zu cyanobakteriellen oder bakteriellen Phytochromen zwei PAS-Wiederholungen. Phytochrome bestehen aus einer HKD am C-Terminus, welcher im Fall von pilzlichen und einigen bakteriellen Phytochromen direkt die dazugehörige Antwortregulator-Domäne (RRD) folgt.

### 2.1.2 Pflanzliche Phytochrome (Phy)

Pflanzliche Phytochrome sind lösliche homodimere Proteine bestehend aus zwei Untereinheiten mit einer Größe von je ca. 125 kDa. Die Domänenstruktur der bekannten pflanzlichen Phytochrome ist in Abbildung 2 dargestellt. Der Chromophor ist Phytochromobilin (PΦB) (Abb. 4) (Rüdiger & Thümmler, 1994), welcher in einer autokatalytischen Reaktion kovalent am konservierten Cysteinrest in der BLD über eine



Thioetherbindung gebunden wird. Dieser konservierte Cysteinrest ist ein Hauptmerkmal, welches pflanzliche (Phy) von bakteriellen (Bphs) Phytochromen unterscheidet.

Phytochrome werden im Dunkeln in ihrer physiologisch inaktiven Pr-Form gebildet. Durch Einwirkung von hellrotem Licht entsteht die aktive Pfr-Form, welche im Dunkeln in einem nicht-photochemischen Prozess zur Pr-Form umgewandelt wird. Dunkelreversion ist somit eine Möglichkeit, die Aktivität bzw. Signale des Phytochroms zu stoppen (Eichenberg *et al.*, 2000). Pflanzliche Phytochrome enthalten im Gegensatz zu anderen Phytochromen einen Serin- oder Threoninrest in der C-terminalen Domäne. Obwohl der konservierte Histidinrest fehlt, bezeichnet man sie aufgrund funktioneller und struktureller Homologien als HKD (Schneider-Poetsch *et al.*, 1991). Pflanzliche Phytochrome sind somit Serin/Threoninkinasen, welche von Histidinkinasen abstammen (Yeh & Lagarias, 1998). Die Kinaseaktivität pflanzlicher Phytochrome ist lichtabhängig, wobei die Aktivität in der Pfr-Form höher ist als in der Pr-Form (Yeh & Lagarias, 1998)

In Blütenpflanzen werden Phytochrome von einer kleinen, im Kern lokalisierten Genfamilie codiert, was eine wiederholte Genduplikation eines eukaryotischen Phytochrom-Vorläufers während der Evolution widerspiegelt (Mathews *et al.*, 1995). In der am besten charakterisierten Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gibt es fünf verschiedene Gene (*phyA-phyE*) (Clack *et al.*, 1994), die für ein Phytochrom codieren, während in monokotyledonen Pflanzen wie Mais oder Reis nur die Gene *phyA-phyC* vorhanden sind (Mathews & Sharrock, 1997). In primitiven Pflanzen wie Gymnospermen, Moosen, Farnen oder Algen ist die Anzahl der verschiedenen Phytochromspezies nicht bekannt.

Phytochromabhängige Reaktionen werden in drei Gruppen eingeteilt: R-FR-reversible „*low fluence response*“ (LFR), R-abhängige „*very low fluence response*“ (VLFR) (Shinomura *et al.*, 1996) und eine FR „*high irradiance response*“ (HIR) (Furuya & Schafer, 1996). Durch physiologische Untersuchungen mit Phytochrom-defizienten Mutanten wurden die Funktionen jeder Phytochromspezies aufgeklärt. Obwohl alle fünf Phytochrome in rotem Licht aktiv sind, zeigt jede Spezies charakteristische, aber auch überlappende biologische Funktionen (Quail *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2002). PhyA ist der einzige Photorezeptor, der sowohl für VLFR als auch für FR induzierte HIR verantwortlich ist. PhyA kontrolliert die Deetiolierung unter Dunkelrotlicht und außerdem ist es durch die hohe Lichtsensitivität möglich, die Keimung von Sämlingen unter schwachem Lichteinfall zu kontrollieren (Hartmann *et al.*, 1997). Die anderen Phytochrome kontrollieren klassische R-FR reversible LFR unter kontinuierlichem hellrotem Licht. PhyB ist an Prozessen wie Samenkeimung, Deetiolierung oder Stengelwachstum beteiligt (Devlin *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1993),

während PhyD und PhyE die Internodienverlängerung und Blütezeit zur Schattenvermeidung kontrollieren (Devlin *et al.*, 1998; Devlin *et al.*, 1999). Die Signalkaskade stromabwärts des primären Photorezeptors ist nur teilweise bekannt. Ein wichtiger Weg der Weitergabe des Signals stellt die Expression verschiedener Gene dar, die direkt mit den Kern-Proteinen interagieren können (Ni *et al.*, 1999).

### 2.1.3 Cyanobakterielle Phytochrome (Cphs)

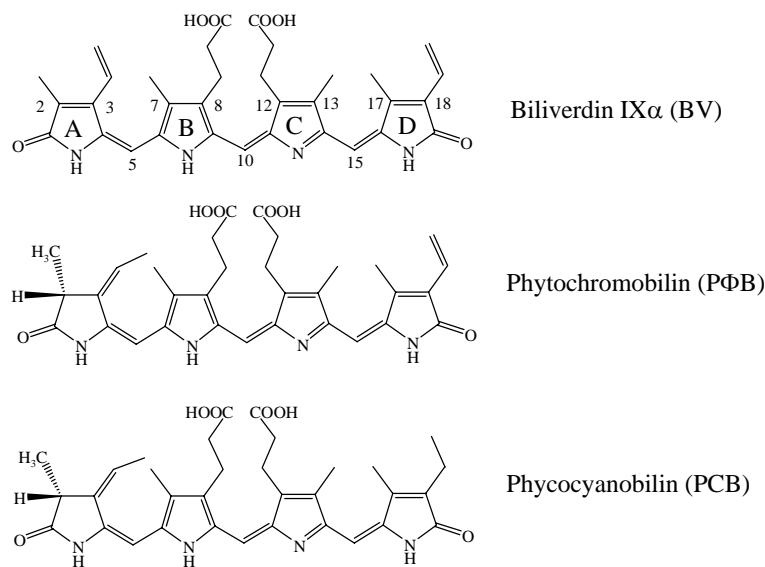
Zu der Familie der cyanobakteriellen Phytochrome gehören Phytochrome hoher Variabilität. Dazu zählen klassische cyanobakterielle Phytochrome (Cph1 oder C-Typ Bph), welche eine hohe Similarität zu pflanzlichen Phytochromen aufweisen, Phytochrome (Cph2 oder B-Typ Bph), die den bakteriellen Phytochromen aus heterotrophen Bakterien ähneln sowie Phytochrom-ähnliche Proteine.

#### 2.1.3.1 Klassische cyanobakterielle Phytochrome

Klassische cyanobakterielle Phytochrome (Cph1) enthalten außer der serinreichen Region am N-Terminus, welche in pflanzlichen Phytochromen vorhanden ist, alle photosensorischen Subdomänen (P2, BLD, PHY), sowie eine Histidinkinasedomäne am C-Terminus. Als erstes repräsentatives cyanobakterielles Phytochrom wurde Cph1 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Hughes *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997) identifiziert. Weitere wichtige Vertreter sind z.B. CphA aus *Calothrix* sp. PCC7601 (Jorissen *et al.*, 2002) oder AphA aus *Anabaena* sp. PCC 7120. Wie pflanzliche Phytochrome binden sie Phytobiline autokatalytisch an einem konservierten Cysteinrest in der BLD kovalent über eine Thioetherbindung und bilden so R-FR-photoreversible Chromoproteine (Hubschmann *et al.*, 2001; Lamparter *et al.*, 2001; Jorissen *et al.*, 2002).

Cyanobakterielle Apoproteine verwenden Phycocyanobilin (PCB) anstatt Phytochromobilin (PΦB) (Abb. 4) als Chromophor, welcher, wie in Pflanzen auch, über die Ethyliden-Seitengruppe im A-Ring des Chromophors die Thioetherbindung mit dem Apoprotein knüpft (Park *et al.*, 2000). PCB wird in Cyanobakterien in großen Mengen als Pigment für die Photosynthese gebildet. Es ist an Phycobiliproteinen in den als Phycobilisomen bezeichneten Lichtsammelkomplexen gebunden. *Synechocystis* Cph1 zeigt nach Assemblierung mit PCB charakteristische R/FR-Spektren, wobei die Pr-/Pfr-Absorptionsmaxima (654 nm und 706 nm) im Vergleich zu den Absorptionsmaxima pflanzlicher Phytochrome (666 nm und 730 nm) eine leichte Blauverschiebung aufweisen. Diese kann durch das Fehlen einer Doppelbindung im  $\pi$ -Elektronensystem des Chromophors PCB im Vergleich zu PΦB (Abb.

4) bzw. durch das Fehlen einer serinreichen Region am N-Terminus erklärt werden. Cph1 und CphA sind als lichtregulierte Histidinkinasen beschrieben. Sowohl die Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrests in der Kinasedomäne als auch die anschließende Phosphatgruppenübertragung auf einen Aspartatrest im Antwortregulator sind lichtabhängig (Yeh *et al.*, 1997; Hubschmann *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu pflanzlichen Phytochromen, bei denen die Pfr-Form die aktive Form darstellt, ist die Histidinkinaseaktivität der cyanobakteriellen Phytochrome Pr-abhängig.



**Abbildung 4:** Struktur der Biline Biliverdin (BV IXα), Phytochromobilin (PΦB) und Phycocyanobilin (PCB). Stellvertretend für alle offenkettigen Tetrapyrrole ist in BV die Numerierung der Kohlenstoffatome sowie die Bezeichnung der Pyrrolringe aufgeführt.

### 2.1.3.2 Weitere cyanobakterielle Phytochrome

Weitere cyanobakterielle Phytochrome sind z.B. CphB aus *Calothrix* sp. PCC7601 oder Cph2 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Sie gehören zur sogenannten Cph2-Familie (B-Typ Bph), welche ausschließlich in Cyanobakterien gefunden wird (Montgomery & Lagarias, 2002).

Die Domänenstruktur von CphB gleicht der Struktur bakterieller Phytochrome, wodurch man CphB auch zu den Bphs zählen kann. Für CphB konnte gezeigt werden, dass BV IXα der natürliche Chromophor ist, welcher jedoch nicht kovalent gebunden wird. Da der konservierte Cysteinrest in der GAF-Domäne fehlt, wird ein Histidinrest, welcher dem chromophorbindenden Cysteinrest benachbart ist, als mögliche Chromophorbindestelle

diskutiert (Quest & Gartner, 2004). Eine andere Chromophorbindestelle könnte jedoch auch ein konserviertes Cystein in der N-terminalen PAS-Domäne sein (Lamparter *et al.*, 2003).

Mit Ausnahme von Cph2 bestehen andere Mitglieder dieser Gruppe aus zwei bis vier GAF-Domänen und einer C-terminalen HKD. Die N-terminale GAF-Domäne gleicht der BLD-Domäne aus pflanzlichen bzw. aus klassischen cyanobakteriellen Phytochromen, in welcher der konservierte Cysteinrest lokalisiert ist. Cph2 aus *Synechocystis* besitzt zwei mögliche Chromophorbindedomänen und es konnte gezeigt werden, dass ein Cystein in der N-terminalen GAF-Domäne den Chromophor bindet (Park *et al.*, 2000). Cph2 assembliert mit PCB und PΦB *in vitro* und zeigt charakteristische R/FR-Photoreversibilität.

### 2.1.3.3 Phytochrom-ähnliche Proteine in Cyanobakterien

In Cyanobakterien wurden auch Phytochrom-ähnliche Proteine entdeckt, die sich biochemisch von „echten“ Phytochromen unterscheiden. Als Beispiele sind zu nennen RcaE aus *Fremyella diplosiphon*, CikA aus *Synechococcus elongatus* sowie TaxD1 und PixJ1 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Das Phytochrom-ähnliche Protein RcaE (*response to chromatic adaptation*) ist in *F. diplosiphon* zusammen mit weiteren Komponenten wie z.B. RcaC oder RcaF an der komplementären chromatischen Adaptation („*complementary chromatic adaptation*“ (CCA)) beteiligt (Kehoe & Grossman, 1996, 1997). RcaE besitzt eine GAF-Domäne und ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in der Lage Bilin zu binden. Das entstehende Holoprotein reagiert jedoch nicht auf rotes und dunkelrotes Licht, sondern auf grünes und rotes Licht (Terauchi *et al.*, 2004). Ein konservierter Cysteinrest in der GAF-Domäne ist wahrscheinlich an der Bilinbindung beteiligt.

Obwohl CikA aus *S. elongatus* bei der Lichtwahrnehmung eine Rolle spielt, handelt es sich nicht um ein typisches Phytochrom. CikA ist an der Synchronisation der inneren Uhr bei sich von hell auf dunkel ändernden Lichtverhältnissen beteiligt (Schmitz *et al.*, 2000). CikA besitzt eine GAF-Domäne am N-Terminus, der eine HKD und ein Antwortregulatorelement folgen. Obwohl in der GAF-Domäne keine konservierten Cystein- oder Histidinreste vorhanden sind, ist CikA *in vitro* in der Lage, PCB und PΦB zu binden. Das Holoprotein ist jedoch nicht R/FR-photoreversibel (Mutsuda *et al.*, 2003). Aus *S. elongatus* extrahiertes CikA ist kein Biliprotein, was zeigt, dass das Protein *in vivo* diese Chromophore nicht assembliert.

TaxD1 aus *Synechocystis* gehört ebenfalls zur Familie der Phytochrom-ähnlichen Proteine und ist an der Phototaxis zu schwachem Rot- bzw. Dunkelrotlicht beteiligt. TaxD1 besteht aus zwei GAF-Domänen, wobei eine Domäne einen Cystein- und Histidinrest, die andere

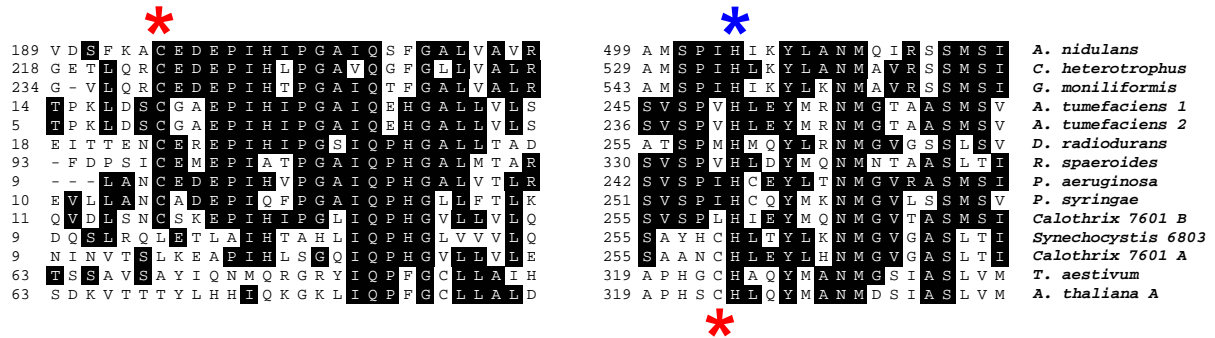
Domäne einen Cysteinrest als mögliche Chromophorbindestelle enthält. Die Fähigkeit Biline zu binden wurde jedoch bis jetzt noch nicht nachgewiesen. Eine C-terminale HKD ist in TaxD1 nicht vorhanden.

PixJ1 aus *Synechocystis* ist ein Pigment-bindendes Protein, welches auf blaues bzw. grünes Licht reagiert und spielt eine Rolle bei der Phototaxis. Es besteht aus zwei GAF-Domänen, wobei gezeigt werden konnte, dass ein Cystein- und ein Histidinrest in der zweiten GAF-Domäne an der Chromophorbindung beteiligt sind (Yoshihara *et al.*, 2000). Der Chromophor von PixJ1 ist noch nicht bekannt. Da die Absorptionsmaxima hier im Vergleich zu den Absorptionsmaxima klassischer Phytochromenspektren eine Blauverschiebung von 200 nm zeigen, kann man jedoch ausschliessen, dass es sich bei dem Chromophor um PΦB, PCB oder BV handelt.

#### 2.1.4 Bakterielle Phytochrome (Bphs)

Die Domänenstruktur bakterieller Phytochrome ähnelt der klassischer cyanobakterieller Phytochrome (Abb. 2). Ein Charakteristikum dieser Phytochromfamilie ist jedoch, dass bei den meisten Vertretern der konservierte Cysteinrest in der GAF-Domäne, welcher in Pflanzen und Cyanobakterien die Chromophorbindestelle darstellt, fehlt und durch eine kleine hydrophobe Aminosäure ersetzt ist (Abb. 5). Während die meisten Phytochrome dieser Familie in nicht-photosynthetischen Bakterien und Purpurbakterien gefunden werden (Bhoo *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 1999b; Giraud *et al.*, 2002), kommen sie auch in einigen Cyanobakterien (Herdman *et al.*, 2000) und Pilzen vor. Eine wichtige Eigenschaft, die bakterielle Phytochrome (Bphs) von cyanobakteriellen (Cphs) und pflanzlichen (Phy) Phytochromen unterscheidet, ist die Art des verwendeten Chromophors und die Position der Chromophorbindestelle. Assemblierungsstudien haben ergeben, dass Bphs Biliverdin (BV) als Chromophor verwenden (Bhoo *et al.*, 2001). Die entstehenden Holoproteine zeigen charakteristische Pr/Pfr-Spektren, wobei die Maxima der Spektren mit 698 nm und 750 nm im Vergleich zu Absorptionsspektren pflanzlicher Holophytochrome eine Rotverschiebung aufweisen. Dies ist durch das im Vergleich zu PΦB ausgeprägtere  $\pi$ -Elektronensystem zu erklären (Abb. 4) (Bhoo *et al.*, 2001; Karniol & Vierstra, 2003; Lamparter *et al.*, 2002). Genetische Analysen bestätigen die Verwendung von BV als Chromophor. In vielen Spezies liegt das Gen, welches für das apo-Phytochrom codiert, in einem Operon mit einem Hämoxygenase-codierenden Gen vor (Bhoo *et al.*, 2001; Giraud *et al.*, 2002). Beispiele sind das *bph*-Operon aus *D. radiodurans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae* und *Rhizobium*

*leguminosarium* bzw. *Bradyrhizobium* und *Rhodopseudomonas palustris*, in denen das Hämoxygenasegen in der Nähe des Phytochromgens liegt. In den meisten heterotrophen Bakterien sind außerdem keine Gene vorhanden, die für Bilinreduktasen codieren, was die Verwendung von BV als Chromophor zusätzlich unterstützt (Bhoo *et al.*, 2001).



**Abbildung 5:** Aminosäurealignment der zwei möglichen Chromophorbinderegionen. Links, mögliche Bindestelle der bakteriellen Phytochrome, die in der P2-Domäne lokalisiert ist; rechts, Teile der GAF-Domäne, die für cyanobakterielle und pflanzliche Phytochrome die Chromophorbindestelle ist; Sterne markieren Cystein- und Histidinreste, die an der Chromophorbindung beteiligt sind; schwarzer Hintergrund zeigt identische Aminosäuren an.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von Bphs ist das Vorhandensein eines konservierten Cysteinrests in der N-terminalen PAS-Domäne (Abb. 5). Für die Phytochrome Agp1 und Agp2 aus *A. tumefaciens* wurde gezeigt, dass BV kovalent an diesem N-terminalen Cysteinrest gebunden wird (Lamparter *et al.*, 2002; Lamparter *et al.*, 2004). Im Vergleich dazu wurde für das Phytochrom aus *D. radiodurans* ein Histidinrest in der GAF-Domäne als mögliche Chromophorbindestelle diskutiert (Davis *et al.*, 1999b). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der Chromophor auch hier an einem Cysteinrest in der N-terminalen PAS-Domäne gebunden wird (Karniol *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2005).

Die meisten Bphs enthalten eine C-terminale Histidinkinasedomäne und es konnte für viele gezeigt werden, dass es sich um lichtregulierte Histidinkinasen handelt. Beispiele sind Agp1 und Agp2 aus *A. tumefaciens* (Karniol and Vierstra, 2003; Lamparter *et al.*, 2002) oder BphP aus *P. syringae* (Bhoo *et al.*, 2001).

Obwohl aus spektroskopischen Untersuchungen hervorgeht, dass sich die meisten Bphs wie typische Phytochrome verhalten (R/FR-Photoreversibilität, Histidinkinaseaktivität), ist ihre Funktion in den meisten Bakterien noch unbekannt. Ein Carotenoid-defizienter Phänotyp in Bph-Mutanten von *D. radiodurans* (Davis *et al.*, 1999b) und Chalconsynthase-defiziente Mutanten in *Rhodospirillum centenum* (Jiang *et al.*, 1999) liefern Hinweise, dass Bphs als

Regulatoren in der Pigmentbiosynthese, deren Produkte lichtschützende Funktion in diesen Organismen haben, fungieren.

#### **2.1.4.1 Das bakterielle Phytochrom aus *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium. Es ist beweglich und kommt an Standorten wie Wasser und Boden, aber auch an Pflanzen- oder Tiergewebe vor. *P. aeruginosa* ist in der Lage, Biofilme an feuchten Oberflächen auszubilden und ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium.

*P. aeruginosa* gehört zu den ersten nicht-photosynthetischen Bakterien, in denen ein Gen identifiziert wurde, das für ein Phytochrom (*PaBphP*) codiert. Die Domänenstruktur entspricht dem Aufbau bakterieller Phytochrome (Abb. 2) mit einem konservierten Cysteinrest in der N-terminalen PAS-Domäne und einer C-terminalen Histidinkinasedomäne. *PaBphP* ist eine typische Sensorkinase eines prokaryotischen Zwei-Komponenten-Signalsystems, wobei der Antwortregulator noch nicht identifiziert wurde.

#### **2.1.5 Phytochrome aus Pilzen (Fphs)**

In verschiedenen filamentösen Pilzen wurden Phytochrom-ähnliche Sequenzen gefunden, was zum ersten Mal auf die Existenz von Phytochromen außerhalb des Pflanzen- bzw. Bakterienreichs hinweist (Bhoo *et al.*, 2001). In den Genomen der Ascomyceten *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *Magnaporthe grisea* und den Genomen der Basidiomyceten *Ustilago maydis* und *Cryptococcus neoformans* wurden mögliche Phytochromproteine identifiziert. Diese Proteine sind jedoch nicht in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* oder *Ashbya gossypii* vorhanden. Die Familie der pilzlichen Phytochrome (Fphs) scheint den bakteriellen Phytochromen (Bphs) nah verwandt zu sein (Abb. 2, Abb. 5). Sie bestehen aus einer GAF-Domäne, in welcher der konservierte Cysteinrest, der in Pflanzen und Cyanobakterien an der kovalenten Bindung des Chromphors beteiligt ist, gegen eine kleine hydrophobe Aminosäure ausgetauscht ist. Wie bakterielle Phytochrome besitzen Fphs in der N-terminalen PAS-Domäne einen konservierten Cysteinrest (Catlett *et al.*, 2003). Alle bisher identifizierten Fphs enthalten eine typische HKD, der ein Antwortregulator direkt folgt, was darauf hinweist, dass es sich bei diesen um Hybridkinasen handelt.

##### **2.1.5.1 Das Phytochrom aus *Aspergillus nidulans***

*A. nidulans* gehört zu den filamentös wachsenden, homothallischen Ascomyceten, zu denen z.B. auch *Neurospora crassa* und *S. cerevisiae* zählen. Der taxonomisch korrekte Name lautet

aufgrund des vollständig holomorphen Lebenszyklus (sexueller und asexueller Zyklus), *Emericella nidulans*. Durch die leichte Kultivierbarkeit und das Durchlaufen der verschiedenen Lebenszyklen wurde *A. nidulans* als Modellorganismus eingeführt (Pontecorvo *et al.*, 1953). In seiner Hauptlebensphase ist *A. nidulans* haploid, wodurch Mutationen direkt phänotypisch sichtbar werden. Das relativ kleine haploide Genom von ca. 31 Mb mit ca. 12000 Genen verteilt auf acht Chromosomen ist komplett sequenziert (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus>).

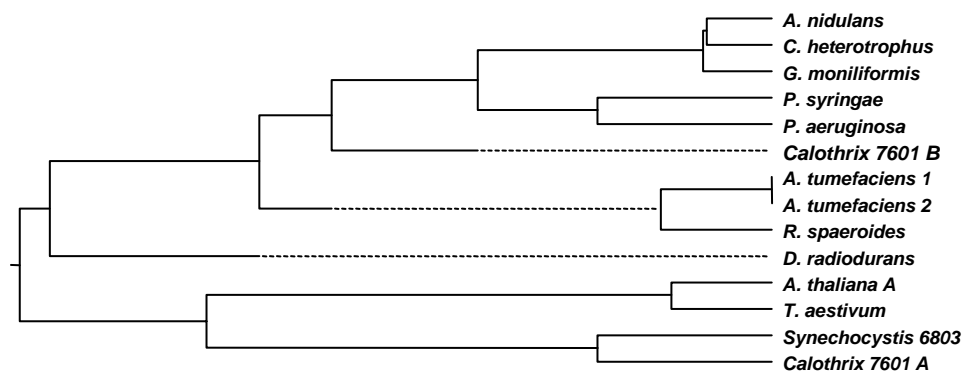
*A. nidulans* kann zwei unterschiedliche Differenzierungswege durchlaufen. Die asexuelle Entwicklung unter Bildung von Konidiophoren und die sexuelle Entwicklung unter Bildung von Kleistothezien. Welcher Weg eingeschlagen wird, ist von externen und internen Signalen abhängig. Die Rezeptoren, die diese Signale wahrnehmen, sind noch weitestgehend unbekannt. Ein wichtiger Faktor jedoch, der Einfluß auf die morphologische Entwicklung hat, ist rotes Licht (Mooney & Yager, 1990). Licht mit einer Wellenlänge von 680 nm führt zu einer lichtinduzierten Konidienbildung, d.h. in Gegenwart von hellrotem Licht geht *A. nidulans* in die asexuelle Entwicklung über, während im Dunkeln der sexuelle Zyklus aktiviert ist. Der Effekt des hellroten Lichts lässt sich durch Bestrahlen mit dunkelrotem Licht wieder aufheben. Es wurde somit bereits Anfang der 90er Jahre postuliert, dass das Lichtsignal ähnlich wie in Pflanzen über ein Phytochrom wahrgenommen wird (Timberlake, 1991).

### 2.1.6 Evolution

Phytochrome sind weit verbreitete Photorezeptoren und es werden, soweit bekannt ist, drei verschiedene Biline als Chromophor genutzt. Pflanzliche Phytochrome nutzen Phytochromobilin (PΦB), viele cyanobakterielle Phytochrome Phycocyanobilin (PCB), bakterielle und auch pilzliche Phytochrome verwenden Biliverdin (BV). Zur Bildung von BV aus Häm ist, im Gegensatz zur Synthese von PCB und PΦB, nur ein einziges Enzym notwendig (Bhoo *et al.*, 2001). Dies lässt vermuten, dass die bakteriellen Biliverdin-bindenden Phytochrome die Vorläufer aller Bilin-bindender, lichtabhängiger Rezeptoren sind. Biliverdin-bindende Phytochrome besitzen einen konservierten Cysteinrest in der N-terminalen PAS-Domäne als Chromophorbindestelle. Während der Evolution cyanobakterieller und pflanzlicher Phytochrome hat sich sowohl diese Bindestelle verschoben als auch der verwendete Chromophor verändert. Ein konservierter Cysteinrest in der BLD ist die Bindestelle für die Chromophore PCB und PΦB.



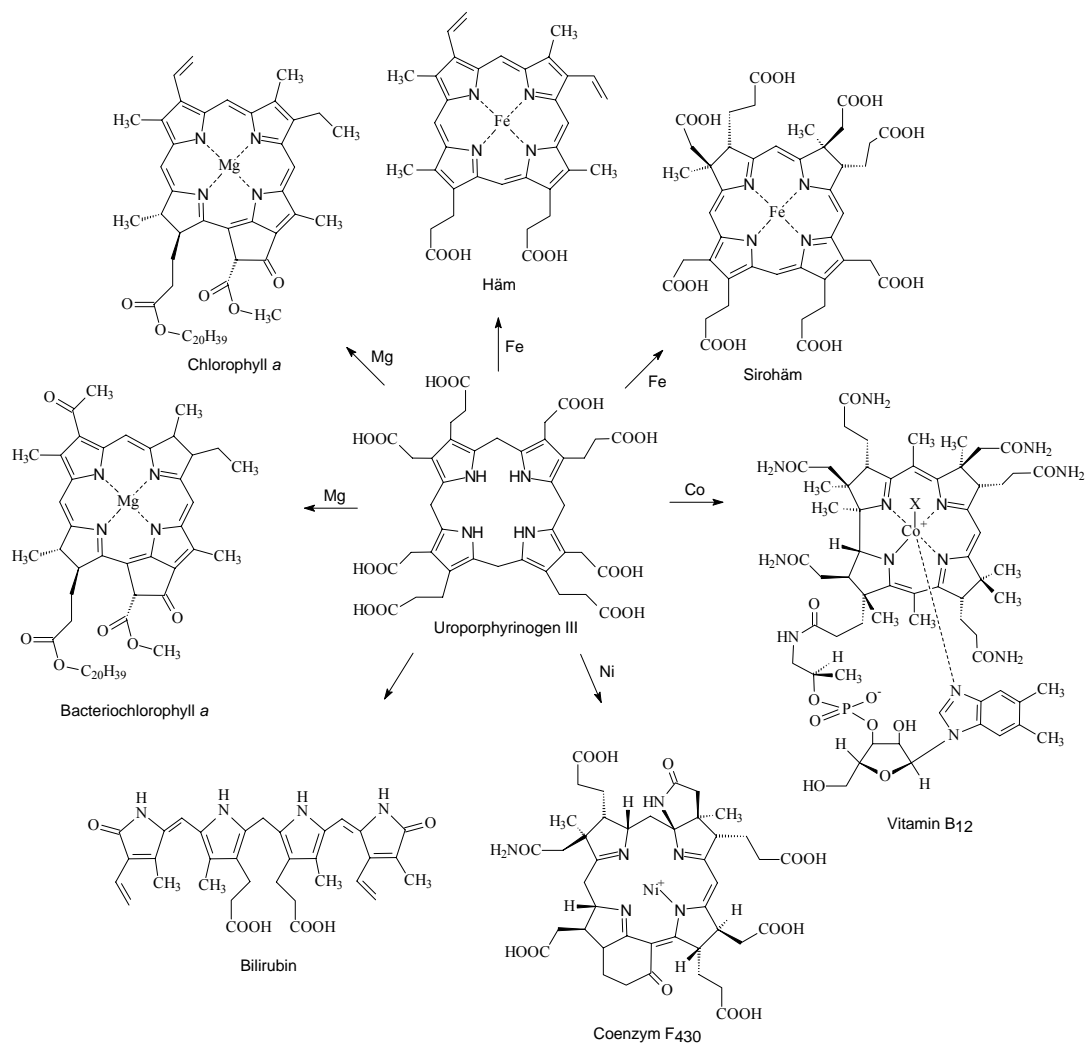
Ausgehend von der Entwicklung bakterieller Phytochrome sind cyanobakterielle und pilzliche Phytochrome entstanden (Abb. 6). Cyanobakterien verwenden PCB als Chromophor, welches auch als Pigment in den Phycobilisomen bekannt ist. Das Pr-Spektrum von PCB-Cphs überlappt im Gegensatz zu dem Pr-Spektrum von BV-Bphs stark mit dem Absorptionsspektrum von Chlorophyll, wodurch Cyanobakterien Licht dieser Wellenlänge stärker ausnutzen können. Phytochrome in Pilzen sind höchstwahrscheinlich auch aus Bphs hervorgegangen. Der verwendete Chromophor scheint BV zu sein und die N-terminale PAS-Domäne enthält ein konserviertes Cystein als Chromophorbindestelle. Im Gegensatz dazu scheinen Phytochrome aus Pflanzen von einem cyanobakteriellen Vorläufer während der Chloroplastenentwicklung entstanden zu sein (Vierstra & Davis, 2000). Nach der Endosymbiontentheorie gehen die Plastiden höherer Pflanzen auf einen Vorfahren der Cyanobakterien zurück, der mit einer eukaryotischen Wirtszelle in Symbiose lebt.



**Abbildung 6:** Phylogenetische Beziehung der GAF-Domänen verschiedener Phytochrome.

## 2.2 Tetrapyrrole

Tetrapyrrole spielen bei vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle und sind in fast allen Organismen zu finden. Sie besitzen sowohl zentrale Funktionen bei der elektronentransportabhängigen Energiekonservierung als auch als prosthetische Gruppe verschiedener Enzyme.



**Abbildung 7:** Strukturen von wichtigen Vertretern verschiedener Tetrapyrrolklassen mit ihrem gemeinsamen Vorläufermolekül Uroporphyrinogen III.

Man unterscheidet zwischen zyklischen und offenkettigen Formen, welche sich alle vom Porphyringrundgerüst ableiten. Die bisher bekannten, in der Natur vorkommenden

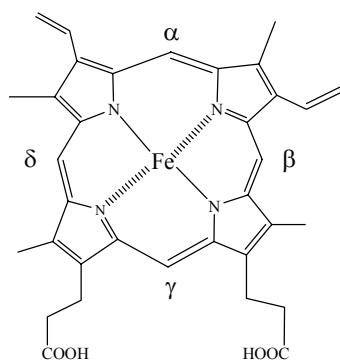
Tetrapyrrole werden, je nach Sättigungsgrad bzw. Art des Ringsubstituenten, in acht Gruppen eingeteilt (Abb. 7): Häme, Chlorophylle, Bacteriochlorophylle, Corrinoide, Cofaktor F<sub>430</sub>, Sirohäm, Häm<sub>d</sub> und offenkettige Tetrapyrrole (Biline). Sie bestehen aus einem Grundgerüst von vier kovalent miteinander verknüpften Pyrrolringen, welche bei zyklischen Tetrapyrrolen über Methinbrücken miteinander verbunden sind. Eine Ausnahme bilden die Corrinoide, bei welchen der vierte Brückenkohlenstoff (C20) fehlt. Eine charakteristische Eigenschaft der meisten Tetrapyrrole ist ihre Farbigkeit, was durch das ausgedehnte  $\pi$ -Elektronensystem erklärt werden kann. Deutlich wird dies z.B. an der grünen Farbe in Pflanzen, welche vom Chlorophyllgehalt abhängig ist.

### 2.2.1 Lineare Tetrapyrrole

Die zu den Gallenfarbstoffen gehörenden offenkettigen linearen Tetrapyrrole, auch Biline genannt (englisch bile - Galle), dienen sowohl als Chromophor des Photorezeptors Phytochrom als auch als Lichtsammelpigmente in den cyanobakteriellen Phycobiliproteinen. Die in der Natur vorkommenden Biline stammen von den Metalloporphyrinen Häm oder Chlorophyll ab. Durch ihr ausgeprägtes konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem sind sie in der Lage, sichtbares Licht zu absorbieren, was die charakteristische Farbe derjenigen Organismen erklärt, in welchen sie gefunden werden.

#### 2.2.1.1 Die vier Biliverdinisomere

Die Spaltung von Häm kann zu vier unterschiedlichen Biliverdinisomeren führen - BV IX $\alpha$ , IX $\beta$ , IX $\delta$  und IX $\gamma$ , wobei die Bezeichnung der Isomere die Position der gespaltenen Kohlenstoffbrücke im Häm widerspiegelt (Abb. 8).



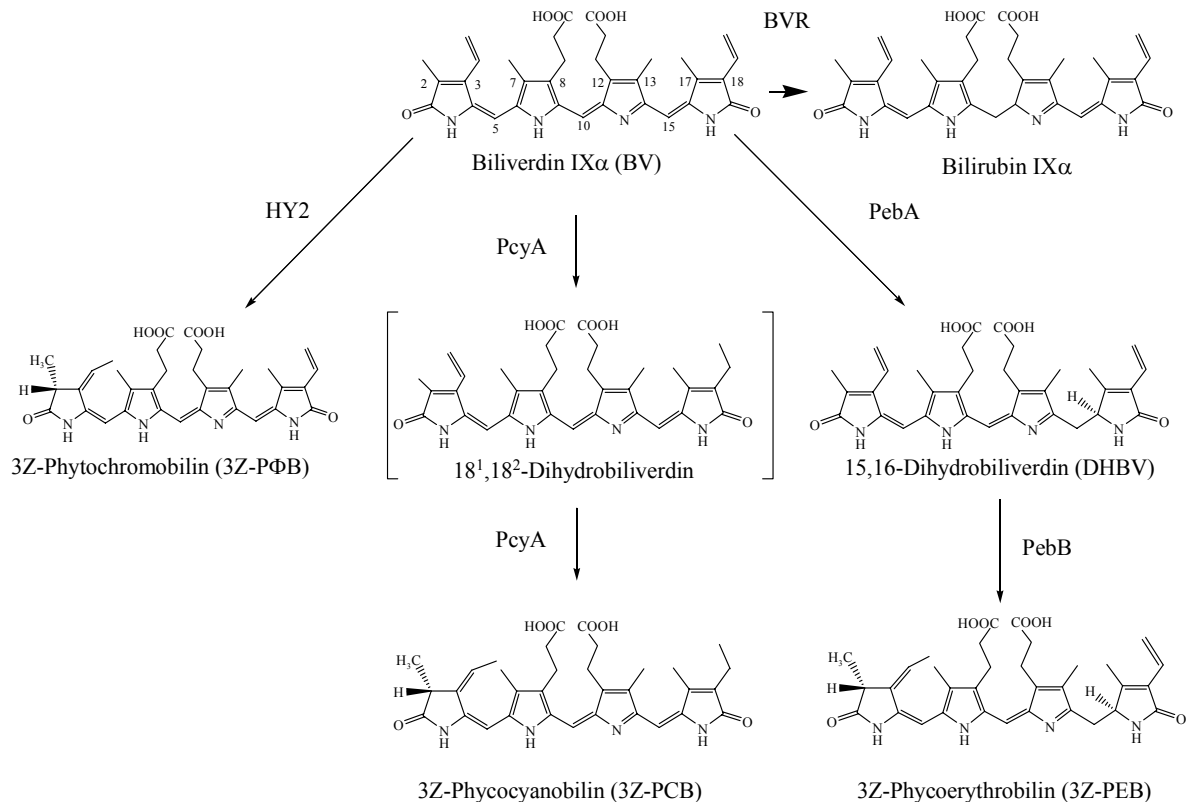
**Abbildung 8:** Struktur von Häm.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  bezeichnet die Position der Kohlenstoffbrücke, an der Häm zur Bildung der Biliverdinisomere gespalten wird.

Alle vier Biliverdinisomere sind in der Natur zu finden, können aber auch chemisch über eine gekoppelte Oxidation von Häm synthetisiert werden. Die an der Spaltung von Häm beteiligten Enzyme sind Hämoxygenasen (HOs). Die meisten HOs spalten den Porphyrinring des Häms spezifisch an der  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke. Für diese Reaktion sind sowohl Sauerstoff als auch Reduktionsäquivalente wie z.B. NADPH oder reduziertes Ferredoxin notwendig. Das in der Natur am häufigsten vorkommende Biliverdin ist somit BV IX $\alpha$ . BV IX $\alpha$  ist z.B. das Substrat für das Enzym Biliverdinreduktase (BVR), welches die Reaktion zu Bilirubin (BR), dem Endprodukt des Hämabbaus in Säugern, katalysiert.

### 2.2.1.2 Biosynthese der Phytobiline

In Pflanzen, Cyanobakterien und Rotalgen werden Phytobiline ausgehend von Biliverdin IX $\alpha$  (BV IX $\alpha$ ) synthetisiert. Dieses entsteht aus Häm, welches zunächst von einer Ferredoxin-abhängigen Hämoxygenase in BV IX $\alpha$ , Eisen und Kohlenmonoxid gespalten wird. Diese Hämoxygenase weist Sequenzähnlichkeiten zu den NADPH-abhängigen Hämoxygenasen der Säuger auf (Cornejo *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 1999a; Muramoto *et al.*, 1999). BV IX $\alpha$  wird anschließend von Bilinreduktasen mit unterschiedlicher Doppelbindungspezifität weiter zu Phycocyanobilin (PCB), Phycoerythrobilin (PEB) bzw. Phytochromobilin (P $\Phi$ B) umgesetzt (Abb. 9).

Die Bildung des Chromophors PCB wird in einem vier-Elektronenschritt durch die Ferredoxin-abhängige Bilinreduktase 3Z-Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase (PcyA) katalysiert (Frankenberg *et al.*, 2001). Für die Umsetzung von BV IX $\alpha$  zu PEB sind zwei Enzyme notwendig, wobei in beiden Katalyseschritten je zwei Elektronen übertragen werden. Die 15,16-Dihydrobiliverdin:Ferredoxin Oxidoreduktase (PebA) katalysiert die Übertragung von zwei Elektronen auf BV IX $\alpha$ , wodurch 15,16-Dihydrobiliverdin (DHBV) entsteht. Dieses dient als Substrat für das Folgenzym 3Z-Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase (PebB), welches DHBV zu 3Z-PEB umsetzt (Beale & Cornejo, 1991a, b, c). P $\Phi$ B, welches der direkte Chromophor-Vorläufer der pflanzlichen Phytochrome ist, wird ausgehend von BV IX $\alpha$  durch eine Ferredoxin-abhängige Phytochromobilin-Synthase (HY2) gebildet (Terry *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997).



**Abbildung 9:** Synthesewege für die Phycobiline PEB, PCB und PΦB ausgehend von BV. BVR, Biliverdinreduktase; PebA, 15,16-Dihydrobiliverdin:Ferredoxin Oxidoreduktase; PebB, 3Z-Phycoerythrobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase; PcyA, 3Z-Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase; HY2, 3Z-Phytochromobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase;

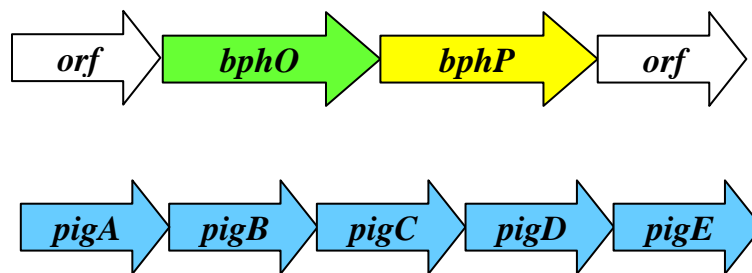
## 2.3 Hämoxygenasen

Hämoxygenasen (HO, [EC 1.14.99.3]) katalysieren in Anwesenheit geeigneter Elektronendonatoren die oxidative Umsetzung von Häm zu Biliverdin, Eisen und Kohlenmonoxid. Hämoxygenasen aus Säugern sind Monooxygenasen, welche Sauerstoff und NADPH benötigen. Bakterielle HOs sind denen aus Säugern sehr ähnlich. Sie benutzen entweder NADPH-Cytochrom P450 Reduktase oder reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator (Zhang *et al.*, 2005; Tenhunen *et al.*, 1969; Wilks & Schmitt, 1998; Schacter *et al.*, 1972). Die erste bakterielle Hämoxygenase wurde aus *Corynebacterium diphtheriae* (HmuO) beschrieben. Dieses Bakterium nutzt unter Eisen-limitierenden Bedingungen das aus der Reaktion freigesetzte Eisen (Wilks & Schmitt, 1998). Die Nutzung des bei der Hämoxygenasereaktion freiwerdenden Eisens konnte auch für andere pathogene

Bakterien wie *Neisseria meningitidis* (HemO), *Corynebacterium ulcerans* (HmuO) oder *Staphylococcus aureus* (IsdG/I) gezeigt werden (Skaar *et al.*, 2004b; Zhu *et al.*, 2000; Schmitt, 1997). Alle bisher charakterisierten HOs aus Bakterien, aber auch aus Säugern und Pflanzen, spalten Häm regiospezifisch an der  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke (Abb. 8) und bilden somit BV IX $\alpha$ . Eine Ausnahme bildet jedoch die Hämoxygenase PigA aus *P. aeruginosa*, welche die ungewöhnlichen Biliverdine IX $\beta$  und IX $\delta$  bildet.

### 2.3.1 Hämoxygenasen in *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* ist der erste beschriebene Organismus mit zwei Hämoxygenasen unterschiedlicher Regiospezifität für Häm (PigA und BphO).

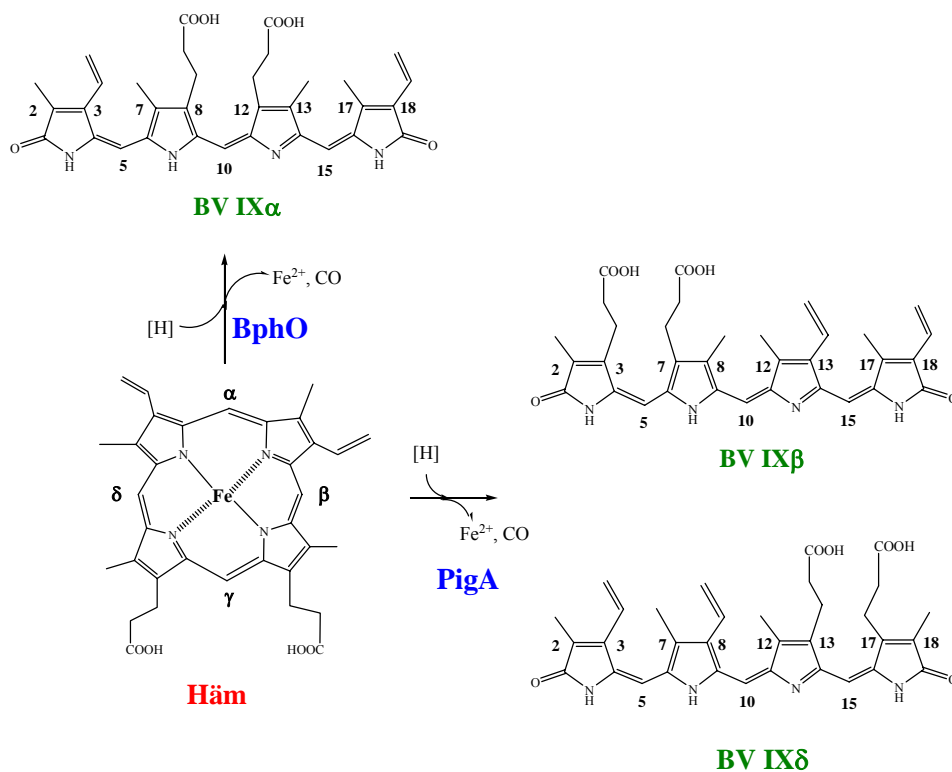


**Abbildung 10:** Organisation des *bphO*- und *pigA*-Operons in *P. aeruginosa*. *bphO*, Hämoxygenasegen, *bphP*, Phytochromgen; *orf*, unbekanntes offenes Leseraster; *pigA*, Hämoxygenasegen.

Das Gen *pigA*, welches bei der Suche nach eisenregulierten Genen gefunden wurde, liegt in einem polycistronischen Operon mit vier weiteren Genen vor (*pigA-pigE*) (Abb. 10). Dieses Operon steht unter der Kontrolle des Eisenregulators Fur („*ferric uptake regulator*“) (Vasil & Ochsner, 1999). Einige dieser Gene codieren für Proteine, die an Prozessen der Eisennutzung beteiligt sind, wie z.B. für einen alternativen Sigma-Faktor (*pigE*) oder für einen Siderophorrezeptor (*pigD*). *PigA* wird unter eisenlimitierenden Bedingungen exprimiert und das Genprodukt weist Homologien zur Hämoxygenase HemO aus *N. meningitidis* auf. *PigA* katalysiert die Bildung der ungewöhnlichen Biliverdine IX $\beta$  und IX $\delta$  in einem Verhältnis von 30:70 (Abb. 11). *PigA* ist damit die erste HO, die im Gegensatz zu allen anderen HOs eine Regiospezifität für die  $\beta$ - bzw.  $\delta$ -Kohlenstoffbrücke besitzt (Ratliff *et al.*, 2001). Diese Regiospezifität kommt durch eine Drehung des Häm-Moleküls zustande. In

PigA ist Häm im Vergleich zu  $\alpha$ -hydroxylierenden HOs um ca. 100 ° gedreht. Dadurch rückt die  $\delta$ -Kohlenstoffbrücke an die Stelle, an der in BV IX $\alpha$ -bildenden HOs die  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke ist (Caignan *et al.*, 2002). Weitere Gründe neben der Eisennutzung für die Bildung dieser BV-Isomere sind noch unbekannt.

Die zweite Hämoxygenase in *P. aeruginosa* ist BphO. Diese spaltet Häm spezifisch an der  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke unter Bildung von BV IX $\alpha$  (Abb. 11). Das Gen *bphO* ist zusammen mit dem Gen *bphP*, welches für das apo-Phytochrom codiert, und zwei weiteren *orfs*, welche für Proteine unbekannter Funktion codieren, in einem Operon lokalisiert (Abb. 10). Die Funktion von BphO scheint somit die Bildung des Chromophors für den Photorezeptor zu sein.



**Abbildung 11:** Hämoxygenasereaktionen in *P. aeruginosa*. Die Hämoxygenase BphO spaltet Häm an der  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffbrücke unter Bildung von BV IX $\alpha$ ; PigA spaltet Häm an der  $\beta$ - bzw.  $\delta$ -meso-Kohlenstoffbrücke unter Bildung von BV IX $\beta$  und IX $\delta$ .

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das Phytochrom aus *P. aeruginosa* (*PaBphP*) rekombinant in *E. coli* zu produzieren und die Reinigung zu etablieren. Das gereinigte Protein *PaBphP* sollte biochemisch charakterisiert werden. Für *PaBphP* sollte sowohl der natürliche Chromophor, die Assemblierung des Chromophors als auch die Bindestelle identifiziert werden. Hierfür wurden gezielt Aminosäurereste des *PaBphP* mittels gerichteter Mutagenese ausgetauscht, resultierende Varianten produziert, gereinigt und analysiert. Außerdem sollte die Funktion von BphP als Histidinkinase betrachtet werden. Dazu diente ein Histidinkinasetest mit radioaktiv markiertem ATP. Neben der biochemischen Charakterisierung sollten auch Untersuchungen über eine mögliche Interaktion zwischen BphP und der Hämoxygenase BphO, deren Gen mit dem Gen *bphP* im gleichen Operon vorliegt, durchgeführt werden. Weiterhin sollte ein potentiell Phytochrom aus *A. nidulans* (FphA) untersucht werden. FphA sollte rekombinant in *E. coli* produziert und die Reinigung etabliert werden. Zur Charakterisierung dienten Assemblierungsexperimente mit dem postulierten natürlichen Chromophor Biliverdin IX $\alpha$  und Experimente zur Aktivität der Histidinkinase.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte und Chemikalien

#### 3.1.1 Geräte

Agarosegelelektrophorese	ChomPhor L Mini ChomPhor L Midi	Biozym
Autoklav	LVSA 50/70	Zirbus
Beleuchtungsapparatur		Lot GmbH
Blotapparatur	Semidry-Blot Trans-Blot <sup>®</sup> SD Mini Trans-Blot <sup>®</sup>	BioRad
CD-Spektrometer	J-810	Jasco
FPLC	ÄKTApurifier	Amersham Bioscience
Fluorimeter	LS50B	Perkin-Elmer
Geldokumentationsanlage	Geldoc	Biorad
HPLC	1100 Series	Agilent Technologies
pH-Meßgerät	pH-Meter C 6840 B	Schott
Phosphoimager	Molecular Imager <sup>®</sup> FX	BioRad
Phosphor-Image Platte	Imaging Screen K	Kodak
Photometer	8453 UV visible System Ultrospec 2000	Agilent Technologies Amersham Bioscience
Pipetten	Labmate	Abimed
PowerSupply	PowerPac 300	Biorad
PVDF-Membran	Roti-PVDF	Roth
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore
Rotlichtfilter	Interferenzfilter 630 nm Wratten Nr. 87 (750 nm)	Lot Kodak
SDS-PAGE Apparatur	Mini Protean 3 System	BioRad
Sequenziergerät	Genetic Ananlyzer ABI Prism <sup>™</sup> 310	Applied Biosystems
Sterilfilter	Filtropur S 0.2	Millipore
Thermocycler	Minicycler	MJ Research
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraschallgerät	HD 2070	Bandelin
Ultrafiltrationsmembran	Centricon-10 Ultrafree-15	Amicon Amicon
Vakuum-Zentrifuge	SpeedvacSPD101B	Savant
Waagen	SBA 52 BL1500	Scaltec Sarorius
Zentrifugen	Centrifuge 5804 Mikro 20 RC-5B Plus L7-65 Ultrazentrifuge	Eppendorf Hettich Zentrifugen Sorvall Beckman

### 3.1.2 Chemikalien, Enzyme und Kits

Cycle sequencing Kit, Big Dye Terminator V1.1	Applied Biosystems
DNA-Ligationskit	Takara
Dialysierschlauch Snake Skin™	Pierce
Easy Pure DNA-Purification Kit	Biozym
[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP	Amersham Bioscience
Markerproteine für SDS-PAGE	Fermentas
NucleoSpin Extract II	Machery-Nagel
Oligonucleotide	Invitrogen
QuikChange™ Mutagenesis Kit	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs
Strep-Tactin-Sepharose	IBA GmbH Göttingen
Taq-Polymerase	Biotherm
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs

Die hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen und in der Qualität *p. a.* benutzt: Amersham Pharmacia, Fermentas, Fluka, Gerbu, Merck, New England Biolabs, Promega, Riedel-de-Haën, Roth und Sigma.

## 3.2 Bakterienstämme und Plasmide

### 3.2.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1:** *E. coli* -Stämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 $\alpha$	F' <i>supE44D(argF-lac)</i> <i>U169</i> <i>j80dlacZΔM15</i> <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
DH10 $\beta$	F' <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>j80dlacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)</i> <i>7697 galU galK λ<sup>-</sup> L nupG</i>	Gibco Life Technologies
BL21(λDE3)	F' <i>ompZ r<sup>-</sup>m<sup>-</sup> λ<sub>lys</sub>PlacUV5-T7-GenlPlac<sup>q</sup>-lacI</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ.M15 Tn10</i> (Tetr)]	Stratagene

### 3.2.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2:** Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pAT-BV	pAT103 Derivat; <i>HoI</i> -Gen aus <i>Synechocystis sp.</i> ; <i>pcyA</i> -Gen entfernt;	Fischer & Lagarias, (nicht publiziert)
pASK- <i>bphP</i>	pASK-IBA3-Derivat; <i>bphP</i> -Gen aus <i>P. aeruginosa</i> in <i>XhoI</i> - und <i>XbaI</i> -Schnittstellen des Vektors;	diese Arbeit
pASK- <i>bphP</i> C12A	pASK- <i>bphP</i> -Derivat; Aminosäureaustausch Cystein 12 gegen Alanin;	diese Arbeit
pASK- <i>bphP</i> C12S	pASK- <i>bphP</i> -Derivat; Aminosäureaustausch Cystein 12 gegen Serin;	diese Arbeit
pASK- <i>bphP</i> H247Q	pASK- <i>bphP</i> -Derivat; Aminosäureaustausch Histidin 247 gegen Glutamin;	diese Arbeit
pASK- <i>bphP</i> C248A	pASK- <i>bphP</i> -Derivat; Aminosäureaustausch Cystein 248 gegen Alanin;	diese Arbeit
pASK- <i>bphP</i> H513A	pASK- <i>bphP</i> -Derivat; Aminosäureaustausch Histidin 513 gegen Alanin;	diese Arbeit
pAB22	pET101/D-TOPO-Derivat; <i>fphA</i> -Gen aus <i>A. nidulans</i> ;	Blumenstein <i>et al.</i> , 2005
pASK- <i>fphA</i>	pASK-IBA3-Derivat; <i>fphA</i> -Gen aus <i>A. nidulans</i> (aus pAB22 amplifiziert) in <i>KpnI</i> - und <i>NdeI</i> -Schnittstellen des Vektors;	diese Arbeit
pASK- <i>fphA</i> C195A	pASK- <i>fphA</i> -Derivat; Aminosäureaustausch Cystein 195 gegen Alanin;	diese Arbeit
pASK-BVR	pASK-IBA-Derivat; <i>bvr</i> -Gen aus Ratte in <i>XhoI</i> - und <i>XbaI</i> -Schnittstellen des Vektors;	Lagarias (nicht publiziert)
pGEX- <i>bphO</i>	pGEX-6P-1-Derivat; <i>bphO</i> -Gen aus <i>P. aeruginosa</i> in <i>BamHI</i> -und- <i>SmaI</i> -Schnittstellen des Vektors;	Wegele <i>et al.</i> , 2004
pGEX- <i>pigA</i>	pGEX-6P-1-Derivat, <i>pigA</i> -Gen aus <i>P. aeruginosa</i> in <i>BamHI</i> -und- <i>XhoI</i> -Schnittstellen des Vektors;	Wegele <i>et al.</i> , 2004
pGEX- <i>pebA</i>	pGEX-6P-3-Derivat; <i>pebA</i> -Gen aus <i>Fremyella diplosiphon</i> in <i>EcoRI</i> -und- <i>XhoI</i> -Schnittstellen des Vektors;	T. Dammeyer (nicht publiziert)

### 3.3 Medien und Medienzusätze

#### 3.3.1 Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde das Vollmedium Luria Bertani (LB) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989).

LB-Medium	Trypton aus Casein	10	g/l
	Hefe-Extrakt	5	g/l
	NaCl	10	g/l

#### 3.3.2 Medienzusätze

Zusätze (Tab.3) wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und jeweils unter sterilen Bedingungen dem autoklavierten Medium zugesetzt.

**Tabelle 3:** Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml	50 µg/ml
IPTG	1 M	250 µM
AHT	2 mg/ml	200 ng/ml

Für Festmedien wurde vor dem Autoklavieren Agar-Agar zu LB-Medium gegeben:

Agar-Agar	15 g/l
-----------	--------

### 3.4 Mikrobiologische Techniken

#### 3.4.1 Sterilisation

Medien und Puffer wurden 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen und Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße des Filters war 0,2 µm).

#### 3.4.2 Bakterienkultivierung

##### Plattenkulturen von Bakterien:

Für Plattenkulturen wurden Bakterien mit einer sterilen Impföse aus einem Glycerinstock oder einer anderen Plattenkultur entnommen und auf eine LB-Agarplatte, die bei Bedarf mit

den gewünschten Zusätzen versehen war, fraktioniert ausgestrichen. Bei Entnahme von Bakterien aus einer Flüssigkultur, wurden diese mittels Drigalski-Spatel auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden ü.N. bei 37 °C invertiert inkubiert.

#### Flüssigkulturen von Bakterien:

Für Vorkulturen wurden je nach Bedarf 50 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit den entsprechenden Zusätzen versehen, mit einer Einzelkolonie beimpft und ü.N. bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Ausgehend von diesen Vorkulturen wurden 500 ml LB-Medium mit der Vorkultur in einem Verhältnis von 1:100 beimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Proteinexpression, wobei die Dauer und Temperatur der Expression entsprechend dem zu produzierenden Protein erfolgte.

### **3.4.3 Bestimmung von Zelldichten**

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde mittels Photometer durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 578 nm bestimmt. Bei Zelldichten mit einer OD<sub>578nm</sub> ≥ 0,8 wurde eine 1:10 Verdünnung vermessen.

Eine OD<sub>578nm</sub> von 1 entspricht einer Zellzahl von 1×10<sup>9</sup> Zellen pro ml.

### **3.4.4 Lagerung von Bakterienstämmen**

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinstocks angelegt. Hierfür wurden 800 µl einer Vorkultur mit 800 µl 80 %igem Glycerin versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

## **3.5 Molekularbiologische Methoden**

### **3.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* -Zellen**

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Rubidium-Chlorid Methode. Hierfür wurden in einem Schikanekolben 200 ml LB-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikazusatz) 1:100 mit einer Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>578nm</sub> von 0,6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 5000 rpm (Sorvall; Rotor SLA 1500) und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 40 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei 4 °C und 5 min Zentrifugation bei 5000 rpm (Centrifuge 5804, A-4-44-Rotor) und 4 °C wurden die

Zellen je nach Volumen des Zellsediments in 0,5 bis 1,0 ml sterilem, eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und 30 bis 60 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert (50 µl Aliquots) und bei -80 °C gelagert.

### 3.5.1.1 Lösungen für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

TFB1-Puffer	Kaliumacetat	30	mM
	CaCl <sub>2</sub>	10	mM
	MnCl <sub>2</sub>	50	mM
	RbCl	100	mM
	Glycerin	15	% (w/v)
	(pH 5,8 titriert mit Essigsäure)		
TFB2-Puffer	Mops pH 6,5	10	mM
	CaCl <sub>2</sub>	75	mM
	RbCl	10	mM
	Glycerin	15	% (w/v)
	(pH 6,5 titriert mit 1M KOH )		

### 3.5.2 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42 °C. 50 µl der kompetenten Zellen wurden mit 0,1-1,0 µg DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock, in dem die Zellen 45 s bei 42 °C inkubiert wurden. Die Zellen wurden 2 min auf Eis gekühlt, mit 500 µl SOC-Medium versetzt und 30 bis 60 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 10 bis 100 µl der Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotikazusätzen ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

#### 3.5.2.1 Lösungen für die Transformation chemisch-kompetenter Zellen

SOC-Medium	Caseinpepton (tryptisch)	20	g
	Hefeextrakt	5	g
	KCl	186,4	mg
	5 M NaCl	2	ml
	mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> auffüllen auf 1000 ml		
	nach dem Autoklavieren zugeben!		
	1 M MgSO <sub>4</sub> + 1 M MgCl <sub>2</sub>	10	ml/l
	2 M Glucose	10	ml/l

### 3.5.3 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-MIDI-Präparationen wurden mit dem NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt, MINI-Präparationen von Plasmid-DNA wurden mittels klassischer alkalischer Lyse gewonnen.

Hierfür wurden 2 ml einer Vorkultur von *E. coli* mit entsprechendem Plasmid für 2 min bei 13000 rpm (Mikro 20) und RT zentrifugiert und das Bakteriensediment in 150 µl GTE-Puffer resuspendiert. Nach 2 min Inkubation bei RT wurden 300 µl NaOH/SDS-Puffer zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Ein Abstoppen der alkalischen Lyse wurde durch Zugabe von 255 µl Natriumacetatpuffer und wiederum 5 min Inkubationszeit erreicht und die Zellreste wurden durch 5 min Zentrifugation bei 13000 rpm (Mikro 20) und RT sedimentiert. 600 µl des Überstandes wurden mit einem Volumenteil Isopropanol zur Fällung der Plasmid-DNA vermischt, 10 min bei 4 °C inkubiert und die Plasmid-DNA durch 30 min Zentrifugation bei 13000 rpm (Mikro 20) und 4 °C präzipitiert. Es folgte ein Waschschriff der Plasmid-DNA mit 250 µl Ethanol (70 %ig) und die Trocknung in einer Vakuum-Zentrifuge. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE oder H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei –20 °C gelagert.

#### 3.5.3.1 Lösungen für die Plasmidpräparation

GTE-Puffer	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	Glucose	50 mM
	EDTA	25 mM
	RNase	100 mg/ml
NaOH/SDS	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)
Natriumacetat-Puffer	Natriumacetat (pH 5,5 titriert mit Essigsäure)	3 M
TE-Puffer	Tris-HCl pH 8,0	100 mM
	EDTA	10 mM

### 3.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung erfolgte photometrisch durch Messung der OD bei 260 nm, 280 nm und 320 nm. Eine OD<sub>260nm</sub> von 1,0 entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Der Reinheitsgrad der Lösung ergab sich aus dem Quotienten zwischen OD<sub>260nm</sub> und OD<sub>280nm</sub>. Dieser sollte für nahezu proteinfreie DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 3.5.5 Agarosegelelektrophorese

Der analytischen Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten diente die Agarosegelelektrophorese. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 90 V-120 V an eine sich in TAE-Laufpuffer befindenden Agarosegelmatrix (1 % (w/v)), erfolgte eine Trennung der Nukleinsäurefragmente in dem so erzeugten elektrischen Feld proportional zum negativen Logarithmus ihrer Länge.

Interkalierende – sich in die Doppelhelix der DNA spezifisch einlagernde Substanzen – können zur visuellen Erfassung der einzelnen Fragmente genutzt werden. In diesem Fall wurde dem Gel vor dem Erstarren Ethidiumbromid (Roth, 0,005 % (v/v)) zugegeben und dessen Fluoreszenz durch die Anregung mit Licht der Wellenlänge 312 nm mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage erfasst. Eine Längenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch Vergleich mit dem Längenstandard „Generuler DNA Ladder Mix“ der Firma Fermentas.

#### 3.5.5.1 Lösungen für Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer	Tris -Acetat pH 8,5	40	mM
	EDTA	1	mM
Agarosegel	Agarose in TAE-Puffer	1	% (w/v)
Probenpuffer	Xylen-Cyanol FF	450	µM
	Bromphenolblau	350	µM
	Orange G	0,25	% (w/v)
	Saccharose in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	115	mM

### 3.5.6 Reinigung von DNA-Fragmenten

Für die Reinigung von PCR-Amplifikaten wurde der gesamte PCR-Ansatz mit dem PCR-Aufreinigungs-Kit (Nucleo Spin Extract II) der Firma Machery-Nagel aufgereinigt. Die Aufreinigung von geschnittenen DNA-Fragmenten zum Entfernen der abgeschnittenen DNA-Stücke erfolgte elektrophoretisch über Agarosegele. Nach Ethidiumbromid-Färbung wurde das entsprechende DNA-Fragment aus dem Agarosegel unter UV-Licht (312 nm) ausgeschnitten und die DNA entweder über ein DNA-Agarosegel-Extraktionskit der Firma Biozym (Easy Pure DNA-Purification-Kit) oder der Firma Machery-Nagel (Nucleo Spin Extract II) extrahiert und in 10 µl bzw. 30 µl Puffer eluiert.



### 3.5.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 30 µl Ansätzen für 3 h bei 37 °C. Es wurden die vom Vertreiber empfohlenen Puffer eingesetzt und die eingesetzte Enzymmenge variierte zwischen 10 und 20 Units. Eine Inaktivierung der Enzyme geschah durch Aufreinigung mit einem DNA-Agarosegel-Extraktionskit.

### 3.5.8 Dephosphorylierung von DNA

Um das Rezyklisieren von linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatenden durch das Enzym SAP („*shrimp alkalische Phosphatase*“, NEB) dephosphoryliert. Bedingungen und Puffer wurden wie vom Hersteller vorgegeben gewählt. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz 5 min bei 65 °C inkubiert.

### 3.5.9 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA wurde entweder mittels T4-DNA Ligase (NEB) in einem 20 µl Ansatz oder mittels Takara-Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Ansatz wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 eingesetzt und der Ansatz ü.N. bei 18 °C inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Transformation des Ligationsansatzes (10 µl) in *E. coli* kompetenten Zellen (Kap. 3.5.2), wobei der gesamte Ligationsansatz ausgestrichen wurde.

### 3.5.10 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die nötigen DNA-Fragmente aus *P. aeruginosa* und *A. nidulans* für die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die Amplifikation aller Nukleinsäure-Fragmente erfolgte in 50 µl Ansätzen.

Das Gen *bphP* (PA 4117) aus *P. aeruginosa* wurde durch PCR mit chromosomaler DNA als „*template*“ amplifiziert, das Gen *fphA* aus *A. nidulans* wurde aus dem Plasmid pAB22 amplifiziert.

## Reaktionsansätze:

10x-BioThermPuffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer fwd. (20 µM)	1 µl
Primer rev. (20 µM)	1 µl
"template"-DNA	50-100 ng
BioThermTaq-Polymerase	1 µl
	ad 50 µl mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

## Amplifikationsbedingungen:

Erste Denaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 sec
Schmelze	55 °C – 58 °C	45 sec
Verlängerung	72 °C	4 min
30 Zyklen		
finale Verlängerung	72 °C	7 min

**3.5.10.1 Verwendete Primer**

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Abkürzungen "fwd" und "rev" im Namen des Oligodesoxynukleotides beschreiben die Orientierung des Primers in der PCR-Amplifikation. Die Abkürzung "fwd" (forward) entspricht einer Vorwärts-, "rev" (reverse) einer Rückwärts-Orientierung. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Die Abkürzung RBS zeigt die Einführung einer Ribosomenbindestelle an.

**Tabelle 4:** Primer

Amplifiziertes DNA-Fragment	Bezeichnung des Primers	Sequenz
<i>bphP</i> aus <i>P. aeruginosa</i>	<i>bphPXba</i> RBSfwd	5'-CGTCTAGATAACGAGGGCAAAA AATGACGAGCATCACCCCGG TTA CC-3'
	<i>bphPXhono</i> STOPrev	5'-CCCTCGAGGGACGAGGAGCCG GTCTCCG-3'
<i>fphA</i> aus <i>A. nidulans</i>	pAB22 <i>KpnI</i> fwd	5'-GGGGTACCTCCGAGCTCCCCTC TCG-3'
	pAB22 <i>NcoI</i> rev	5'-CATGCCATGGGCACCGGTACG CGTAGAATCG-3'

**3.5.11 Gerichtete Mutagenese**

Zur Einführung von Punktmutationen in den Plasmiden pASK-*bphP* und pASK-*fphA* wurde das QuikChange<sup>TM</sup> Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Hierbei wurde die jeweilige Mutation durch

entsprechende Oligodesoxynukleotide (Primer) mittels PCR eingeführt und anschließend die methylierte parentale Plasmid-DNA durch einen *DpnI*-Verdau abgebaut.

**Tabelle 5:** Primer für die ortsgerichtete Mutagenese

Bezeichnung des Primers	Sequenz
<i>bphP</i> C12A	5'-GGTTACCCTGGCGAAC <u>GCCG</u> AGGACGAACCCATCC-3'
<i>bphP</i> C12S	5'-GGTTACCCTGGCGAACT <u>TCCG</u> AGGACGAACCCATCC-3'
<i>bphP</i> H247Q	5'-GCAGCGTTTCGCCGATCC <u>CAGT</u> GCGAATACCTGACC-3'
<i>bphP</i> C248A	5'-CGTTTCGCCGATCCAC <u>GCCG</u> AATACCTGACCAAC-3'
<i>bphP</i> H513A	5'-GCGGTGCTCGGC <u>GCCG</u> ACCTGCGCAAC-3'
<i>fphA</i> C195A	5'-CGTTGACTCTTTCAAAG <u>GCCG</u> CCGAAGACGAGC-3'

Die für die ortsgerichtete Mutagenese benötigten Primer wurden von Invitrogen bezogen und sind in Tabelle 5 aufgeführt. Es ist nur ein Primer gezeigt, der andere ist komplementär. Die neu eingeführten Basen für den entsprechenden Aminosäureaustausch sind hervorgehoben.

### 3.5.12 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzen der erstellten Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft. Diese wurde entweder automatisiert durch die Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt oder mit Hilfe des Sequenziergerätes Genetic Analyzer ABI Prism™ 310, Applied Biosystems. Im letzten Fall handelte es sich um die nichtradioaktive Sequenzierungsmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

#### Sequenzierungsansatz (PCR)

„Premix“ (Perkin Elmer Applied Biosystems)	2 µl
Verdünnungspuffer (Perkin Elmer Applied Biosystems)	2 µl
Primer (3,2 pmol/µl)	1 µl
dsDNA	1 µg/kb
	ad 10 µl mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

Die Sequenzier-PCR wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt.

Aufreinigung des PCR-Ansatzes:

Sequenzierreaktion	10 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	90 µl
3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2)	10 µl
Glykogenlösung (20 µg/µl)	1 µl
EtOH (96 %)	250 µl

Die Lösungen zur Aufreinigung der Sequenzierreaktion wurden 20 min bei RT inkubiert, anschließend 15 min bei 13000 rpm (Mikro 20) und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 12 µl „Template Suppression Reagents“ (Perkin Elmer Applied Biosystems) aufgenommen und 2 min bei 90 °C denaturiert. Die Auswertung der Reaktion erfolgte mit dem Sequenziergerät (Genetic Analyzer ABI Prism™ 310, Applied Biosystems).

## 3.6 Proteinproduktion

### 3.6.1 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung des *Pseudomonas aeruginosa* Phytochroms

#### 3.6.1.1 Bakterienkultivierung

Zur Produktion von rekombinanten *P. aeruginosa* BphP wurde das Strep-tag System der Firma IBA genutzt, bei dem die Expression durch einen Anhydrotetracyclin (AHT)-induzierbaren *tet*-Promotor kontrolliert wird. Als Selektionsmarker enthält das Plasmid ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin.

#### Produktion von apo-BphP:

6 × 500 ml LB-Medium versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin wurden 1:100 mit einer Vorkultur aus pASK-*bphP* enthaltenden *E. coli* DH5α-Zellen bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5 inkubiert. Die Proteinexpression wurde mit AHT (0,2 µg/ml) induziert und die Zellen weiter ü.N. bei 25 °C und 180 rpm inkubiert.

#### Produktion von holo-BphP:

Holo-BphP wurde durch eine Coexpression der Plasmide pAT-BV und pASK-*bphP* in *E. coli* BL21(λDE3) produziert. Hierfür wurden 6 × 500 ml LB-Medium versetzt mit 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin 1:100 mit einer Übernachtskultur von *E. coli* BL21(λDE3)/pAT-BV/pASK-*bphP* angeimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer

OD<sub>578nm</sub> von 0,5 inkubiert. Die Produktion von BV wurde mit 0,5 mM IPTG gestartet und die Kultur bei 25°C und 180 rpm inkubiert. Nach einer Stunde erfolgte die Induktion der BphP-Produktion mit AHT (0,2 µg/ml) und die Zellen wurden ü.N. bei 25 °C und 180 rpm weiter inkubiert.

### **3.6.1.2 Zellaufschluß**

Nach 10 min Zentrifugation der Zellen bei 5000 rpm (Sorvall, Rotor SLA 3000) und 4 °C wurde das Zellsediment in Lysepuffer (3 ml Puffer pro g Zellen) resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonoplus, 3x 5min, 70 % Amplitude, Kegelspitze KE73) aufgeschlossen. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch 30 min Zentrifugation bei 25000 rpm (Beckmann Ultrazentrifuge; Rotor Ti 70.I ) und 4 °C.

### **3.6.1.3 Ammoniumsulfatfällung**

Der erste Reinigungsschritt war eine Ammoniumsulfatfällung, bei der das Prinzip des Aussalzens genutzt wird. BphP präzipitiert bei 40 % Ammoniumsulfat-Sättigung. Pro ml Lysat wurden langsam 0,23 g Ammoniumsulfat zugegeben und der Ansatz für eine Stunde oder über Nacht bei 4 °C gerührt. Der Ansatz wurde 20 min bei 12000 rpm (Sorval, Rotor SS34) und 4°C zentrifugiert. Das Protein befand sich im Zellsediment. Das Sediment wurde in Puffer W (1/4 des Lysatvolumens) resuspendiert und anschließend wurde erneut 30 min bei 16000 rpm (Sorval, Rotor SS34) und 4 °C zentrifugiert. Das Protein befand sich im Überstand, d.h. im Lysat.

### **3.6.1.4 Affinitätschromatographie**

Der nächste Reinigungsschritt war eine Affinitätschromatographie an einer Streptactin Sepharose Tropfsäule mit einem Säulenvolumen von 5 ml. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen Puffer W äquilibriert. Um unspezifische Bindungen biotinylierter Proteine des *E. coli*-Extrakts an der Streptactin-Sepharose Säule zu vermeiden, wurde das Lysat mindestens 10 min auf Eis mit Avidin (40 µg/ml Lysat) inkubiert und anschließend auf die Säule aufgetragen. Danach folgte ein Waschschritt mit 5 Säulenvolumen Puffer W. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit Desthiobiotin, wobei mit 5 Säulenvolumen Puffer E eluiert wurde. Es wurden 1,5 ml-Fractionen gesammelt, die BphP enthaltenden Fractionen mittels SDS-PAGE (Kap. 3.7.1) auf Gehalt und Reinheit überprüft, vereinigt und gegen NS-Puffer dialysiert (Kap.3.6.4). Zur Regeneration der Säule wurde diese mit Puffer W und H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen und mit 5 ml Puffer R behandelt.

### 3.6.1.5 Anionenaustauschchromatographie

Der dritte Reinigungsschritt war eine Anionenaustauschchromatographie an einer HiTrap™Q-Separeose HP Säule. Die gegen NS-Puffer dialysierten Fraktionen nach der Affinitätschromatographie wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen, welche vorher mit NS-Puffer äquilibriert wurde. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 0-100 % HS-Puffer über 10 Säulenvolumen. Es wurden 1,0 ml-Fraktionen gesammelt, die BphP enthaltenden Fraktionen mittels SDS-PAGE (Kap. 3.7.1) auf Gehalt und Reinheit überprüft, vereinigt, gegen einen geeigneten Puffer dialysiert (Kap. 3.6.4) und auf eine Konzentration von 5 mg/ml bis 10 mg/ml konzentriert (Kap. 3.6.5).

## 3.6.2 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung des *Aspergillus nidulans* Phytochroms

### 3.6.2.1 Bakterienkultivierung

Auch zur Produktion von rekombinantem *A. nidulans* FphA wurde das Strep-tag System der Firma IBA genutzt. Es wurde jedoch nur holo-FphA durch eine Coexpression der Plasmide pAT-BV und pASK-*fphA* in *E. coli* BL21(λDE3) hergestellt.

Hierfür wurden 6 × 500 ml LB-Medium versetzt mit 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin 1:100 mit einer Vorkultur von *E. coli* BL21(λDE3)/pAT-BV/pASK-*fphA* angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5 inkubiert. Die Produktion von BV wurde mit 0,5 mM IPTG gestartet und die Kultur bei 25 °C und 180 rpm inkubiert. Nach einer Stunde erfolgte die Induktion der FphA-Produktion mit AHT (0,2 µg/ml) und die Zellen wurden weitere 3 h bei 25 °C und 180 rpm inkubiert.

### 3.6.2.2 Zellaufschluß

Der Zellaufschluß erfolgte wie in Kap. 3.6.1.2 für BphP beschrieben.

### 3.6.2.3 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie erfolgte wie in Kap. 3.6.1.4 für BphP beschrieben. Das Säulenvolumen lag bei 2 ml.

### 3.6.2.4 Gelpermeationchromatographie

Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Gelpermeationchromatographie (GPC) an einer Superdex 200 HR 10/30 Säule getestet. Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumen Hepes-Puffer

äquiliibriert und anschließend wurde die vorher aufkonzentrierte Proteinlösung mit einer Flussrate von 0,4 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Detektion des Proteins erfolgte über die Messung der Absorption bei 280 nm, die Detektion von BV über die Messung der Absorption bei 650 nm. Die FphA enthaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 3.7.1) überprüft, vereinigt und aufkonzentriert (Kap. 3.6.5).

### 3.6.3 Lösungen für die Produktion und Reinigung

Lysepuffer	Tris-HCl pH 8,0	50	mM
	NaCl	100	mM
	MgCl <sub>2</sub>	5	mM
	Triton X-100	0,05	% (v/v)
Puffer W	Tris-HCl pH 8,0	20	mM
	NaCl	20	mM
	EDTA	1	mM
	DTT	1	mM
Puffer E	Desthiobiotin in Puffer W	2,5	mM
Puffer R	HABA in Puffer W	1	mM
NS-Puffer	Hepes-KOH pH 8,0	50	mM
	KCl	20	mM
	DTT	1	mM
HS-Puffer	Hepes-KOH pH 8,0	50	mM
	KCl	1	M
	DTT	1	mM
Hepes-Puffer	Hepes-KOH pH 8,0	50	mM
	KCl	100	mM
	DTT	1	mM

### 3.6.4 Dialyse

Zur Entsalzung und Umpufferung wurden die Proteinlösungen bei einem Volumen kleiner als 1 ml in Dialyseknöpfen und bei größeren Volumina in Dialyseschläuchen ü.N. bei 4 °C gegen mindestens 100 Volumenteile des gewünschten Puffers dialysiert. Die Ausschlussgrenze des verwendeten Dialyseschlauchs betrug 10 kDa.

### **3.6.5 Proteinkonzentrierung**

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden je nach Anfangsvolumen Centricon-10 (max. 2 ml) bzw. Ultrafree-15 (max. 12 ml) Ultrafiltrationsmembrankonzentratoren nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ausschlussgrenze lag bei 50 kDa.

## **3.7 Proteincharakterisierung**

### **3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen. Der Einsatz des denaturierenden und stark negativ geladenen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) erlaubt es, Proteine während der Wanderung in einem elektrischen Feld nur nach ihrer relativen molekularen Masse aufzutrennen (Laemmli, 1970). Eigenladung und Form der Proteine werden durch SDS weitestgehend aufgehoben, so dass sie denaturiert und einheitlich stark negativ geladen sind. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE besteht die Gelmatrix aus einem großporigen Sammelgel (5,25 % Polyacrylamid, pH 6,8) und einem kleinporigen Trenngel (10 % bzw. 7,5 % Polyacrylamid, pH 8,8). Während der Elektrophorese werden die Proteine zunächst an der Grenze zwischen Sammelgel und dem eigentlichen Trenngel fokussiert. Auf diese Weise werden Bandenschärfe und Trennleistung der Elektrophorese erhöht (Righetti, 1990).

Proteinproben für die Elektrophorese wurden zunächst mit SDS-Probenpuffer vermischt und bei 95 °C denaturiert. Proben bestehend aus Kultursediment wurden mit 40 µl Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C gekocht, flüssige Proteinproben wurden in einem Verhältnis von 4:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 2 min bei 95°C gekocht. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1 min bei 13000 rpm (Mikro 20) und RT abzentrifugiert. Eine Auftrennung der Proteine erfolgte im Anschluss bei 120 V. Schließlich wurden die Proteinbanden im Gel entweder im „Semidry-Blot“-Verfahren (s. Kap. 3.7.2) auf eine PVDF-Membran transferiert oder durch Inkubation in Färbelösung und anschließendem Waschen in Entfärbelösung sichtbar gemacht.



**3.7.1.1 Lösungen für die SDS-PAGE**

1 × Laufpuffer	Tris-HCl pH 8,8	50	mM
	Glycin	385	mM
	SDS	0,1	% (w/v)
4 × Sammelgelpuffer	Tris-HCl pH 6,8	1,5	M
	SDS	0,4	% (w/v)
4 × Trenngelpuffer	Tris-HCl pH 8,8	1,5	M
	SDS	0,4	% (w/v)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	APS	10	% (w/v)
Sammelgel (5,25% (w/v)) für 4 Minigle	Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid)	1,4	ml
	4 × Sammelgelpuffer	2	ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	4,6	ml
	APS	30	μl
	Temed	20	μl
Trenngel (10,0% (w/v)) für 4 Minigle	Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid)	5,3	ml
	4 × Trenngelpuffer	4	ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	6,7	ml
	APS	80	μl
	Temed	8	μl
Trenngel (7,5% (w/v)) für 4 Minigle	Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid)	4	ml
	4 × Trenngelpuffer	4	ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	8	ml
	APS	80	μl
	Temed	8	μl
4 × SDS-Probenpuffer	Tris-HCl pH 6,8	100	mM
	SDS	110	mM
	Glycerin	40	% (w/v)
	β-Mercaptoethanol	2	mM
	Spatelspitze Bromphenolblau		
Färbelösung	Essigsäure	10	% (v/v)
	Isopropanol	30	% (v/v)
	Coomassie	0,25	% (w/v)
	Brillant Blue G250		
Entfärbelösung	Ethanol	30	% (v/v)
	Essigsäure	10	% (v/v)
Proteinmarker	Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)		
	Prestained Protein Ladder (Fermentas)		

### 3.7.2 Western-Blot

Bei diesem Verfahren werden Proteine aus einem Polyacrylamidgel mittels Elektrottransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu werden zunächst Gel, Blotpapier und mit Methanol abgesättigte PVDF-Membran in Towbin-Puffer äquilibriert und entweder im „Semidry“-Verfahren 15 min bei 15 V oder im „Tank-Blot“-Verfahren 1h bei 100 V auf die Membran übertragen.

#### 3.7.3.1 Nachweis von immobilisierten Proteinen mittels Antikörpern

Auf einer PVDF-Membran immobilisierte Proteine können durch Antikörper hochspezifisch nachgewiesen werden. Dazu ist ein gegen das Protein gerichteter Primär-Antikörper oder ein gegen den Primär-Antikörper gerichteter Sekundär-Antikörper an ein Enzym gekoppelt, welches eine detektierbare Reaktion katalysiert.

#### Nachweis von Proteinen mit Strep-tagII :

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst 1h oder ü.N. in Blockierungslösung inkubiert. Überschüssige Blockierungslösung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween-Puffer entfernt. Um endogene Biotin-Carboxyl tragende *E. coli*-Proteine spezifisch zu blockieren, wurde die Membran vor der Detektion 10 min mit 2 µg/ml Avidin in PBS-Tween-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 1 h mit Streptavidin-Alkalischer-Phosphatase, einem Antikörperkonjugat, das bereits alkalische Phosphatase enthält, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween-Puffer und zweimaligem mit PBS-Puffer, erfolgte die Detektion mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazolium (NBT) in AP-Puffer. Das an den Antikörper gekoppelte Enzym Alkalische Phosphatase katalysiert mit BCIP und NBT eine Farbreaktion, bei der sich ein blaues Präzipitat auf der Membran bildet. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt.

#### 3.7.3.2 Lösungen für die Durchführung von Western-Blots

Towbin-Puffer	Tris-HCl pH 8,3	25	mM
	Glycin	192	mM
	Methanol	20	% (v/v)
10 × PBS („phosphate buffered saline“)	NaCl	1,37	M
	KCl	27	mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50	mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15	mM
	pH 7,4 titriert mit Phosphorsäure		

Blockierungslösung	BSA	5	% (w/v)
	Tween 20 in 1 × PBS	0,5	% (v/v)
PBS-Tween-Puffer	Tween 20 in 1 × PBS	0,1	% (v/v)
AP-Puffer („Alkalische Phosphatase“)	Tris-HCl pH 9,5	100	mM
	NaCl	100	mM
	MgCl <sub>2</sub>	5	mM
NBT-Lösung	NBT (in 70%DMF)	100	mg/ml
BCIP-Lösung	BCIP (in DMF)	50	mg/ml
Detektionslösung	NBT-Lösung	33	μl
	BCIP-Lösung in AP-Puffer	33	μl

### 3.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration einer gereinigten Proteinlösung kann bei bekannter Aminosäurezusammensetzung des Proteins mit der Methode von Gill und von Hippel bestimmt werden (Gill & von Hippel, 1989). Die Aminosäuren Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Cystein (Cys) absorbieren bei 280 nm. Aus der Häufigkeit dieser Aminosäuren im Protein kann der dekadische Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\epsilon_{280} = (n_{\text{Trp}} \cdot 5690 + n_{\text{Tyr}} \cdot 1280 + n_{\text{Cys}} \cdot 120) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$n_x$ : Anzahl der betreffenden Aminosäure im Protein

$\epsilon_{280}$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm

Mit Hilfe des dekadischen Extinktionskoeffizienten kann die Proteinkonzentration nach Messen der Absorption bei 280 nm berechnet werden.

$$c [\text{mol/l}] = M_r \cdot A_{280} / \epsilon_{280} \cdot d$$

$c$ : Proteinkonzentration in mol/l

$M$ : Molekulargewicht des Proteins in g/mol

$A_{280}$ : Absorption bei 280 nm

$\epsilon_{280}$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in  $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$d$ : Schichtdicke der Küvette in cm

### 3.7.5 Analytische Gelpermeationschromatographie (GPC)

Eine 24 ml Superdex 200 HR 10/30 Gelpermeationssäule wurde mit GPC-Puffer (50 mM Hepes-KOH pH 8,0, 100 mM KCl) bei einer Flussrate von 0,4 ml/min äquilibriert. Zur Eichung wurden je 100 µg Markerprotein mit bekannter Mr (Apoferritin 443.000;  $\beta$ -Amylase 200.000; Alkoholdehydrogenase 150.000; BSA 66.000; Ovalbumin 45.000 und Carboanhydrase 29.000) auf die Säule aufgetragen und das Elutionsvolumen spektroskopisch bei 280 nm verfolgt. 10 µM BphP bzw. 10 µM BphP mit 10 µM freiem oder an BphO/PigA gebundenem BV wurden auf die Säule aufgetragen und Experimente analog zu den Bedingungen der Markerproteine durchgeführt. Zur Detektion von BV wurden alle Proben auch bei 650 nm spektroskopisch verfolgt.

### 3.7.6 Phytochrom - Assemblierungsexperimente

Für Phytochrom-Assemblierungsexperimente wurden lineare Tetrapyrrole in einer Stocklösung von 2 mM in DMSO verwendet.

#### 3.7.6.1 Differenzspektroskopie

Um die Assemblierung von Chromophoren an Phytochrom *in vitro* zu untersuchen, wurden für Phytochrome charakteristische Differenzspektren aufgenommen.

Hierfür wurden 20 µM apo-BphP mit 40 µM Chromophor in einem Endvolumen von 50 µl bzw. 500 µl holo-FphA 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Absorptionsspektren wurden nach 3 min Bestrahlung mit hellrotem Licht (630 nm) (Pfr-Spektrum) und nach 3 min Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (750 nm) (Pr-Spektrum) in einem Volumen von 500 µl aufgenommen und das Differenzspektrum durch Subtraktion des Pfr- vom Pr-Spektrum berechnet.

#### 3.7.6.2 Langzeitexperimente

Zur Charakterisierung der verschiedenen holo-BphP-Formen wurden Absorptionsspektren zwischen 500 nm und 800 nm aufgenommen. 20 µM BV IX $\alpha$  wurden zu 10 µM apo-BphP (Endvolumen 500 µl) gegeben und die Änderung der Absorptionsspektren während einer Inkubation im Dunkeln oder während einer Bestrahlung mit hellrotem (630 nm) bzw. dunkelrotem (750 nm) Licht über die Zeit verfolgt.

### 3.7.6.3 Zink-induzierte rote Fluoreszenz

Kovalente Bindung zwischen Chromophor und Phytochrom kann mittels Zink-induzierter roter Fluoreszenz untersucht werden (Berkelman & Lagarias, 1986).

2  $\mu$ M apo-BphP versetzt mit 4  $\mu$ M Chromophor in einem Volumen von 20  $\mu$ l bzw. 20  $\mu$ l holo-FphA wurden 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert und mit 20  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt. 20  $\mu$ l Probe wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen (Kap. 3.7.1), geblottet (Kap. 3.7.2) und der Blot anschließend 1 h oder ü.N. bei 4 °C in 1,3 M Zinkacetat-Lösung inkubiert. Bei einer kovalenten Bindung des Chromophors am Phytochrom kommt es zu einer zink-induzierten roten Fluoreszenz. Die Auswertung des Blots erfolgte fluorimetrisch an einer Geldokumentationsanlage durch Bestrahlen des Blots mit rotem Licht (Texas Red).

### 3.7.6.4 Bestimmung eines Affinitätskoeffizienten

20  $\mu$ M apo-BphP wurden mit BV IX $\alpha$  unterschiedlicher Konzentration (0 – 100  $\mu$ M) 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert und Absorptionsspektren zwischen 300 und 800 nm aufgenommen. Zur Bestimmung des Affinitätskoeffizienten ( $K_{a\alpha}$ -Wert) wurde der Peak bei 700 nm herangezogen.

### 3.7.6.5 Assemblierungsexperimente nach chemischer Modifikation des Phytochroms

Zur Blockierung von freien Cysteinresten im Protein wurde dieses mit dem Blockierungsreagenz Iodacetamid behandelt.

Apo-BphP wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Iodacetamid (Stocklösung 5 mM) 20 min bei RT inkubiert (Lamparter *et al.*, 2001). Sowohl Differenzspektren wie auch Zink-induzierte rote Fluoreszenz wurden wie in Kapitel 3.7.6.1 und 3.7.6.3 beschrieben durchgeführt.

## 3.7.7 Biliverdinreduktasetest

Um den Komplex zwischen BphP und BV IX $\alpha$  zu charakterisieren, wurde ein Biliverdinreduktasetest durchgeführt. Biliverdinreduktase (BVR) katalysiert die Reaktion von BV IX $\alpha$  zu Bilirubin (BR), welches bei 450 nm absorbiert. Bei einer kovalenten Bindung zwischen BV und BphP sollte es folglich nicht zu der Bildung von BR kommen.

Apo-BphP wurde mit einem Überschuß an BV IX $\alpha$  30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Der so gebildete BphP:BV Komplex wurde über eine NAP-5 Entsalzungssäule, welche mit Tris-Puffer äquilibriert wurde, gegeben, um freies BV IX $\alpha$  vom Komplex abzutrennen. Die Konzentration des im Komplex gebundenen BV wurde spektroskopisch ermittelt, wobei der

für freies BV bestimmte Extinktionskoeffizient bei 680 nm ( $\epsilon_{680}=12400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) herangezogen wurde. Ein Aliquot von ca. 5  $\mu\text{g}$  rekombinantem, zellfreiem BVR-Extrakt aus Ratte wurden zu 20  $\mu\text{M}$  BV im Komplex mit BphP gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems gestartet. Es wurden Spektren zwischen 300 nm und 800 nm aufgenommen und die spektralen Änderungen bei 450 nm beobachtet.

### 3.7.7.1 Lösungen für Biliverdinreduktasetest

Tris-Puffer	Tris-HCl pH 8,7	100	mM
NADPH-regenerierendes System	Glucose-6-phosphat	6,5	mM
	NADP <sup>+</sup>	0,82	mM
	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	1,1	U/ml

### 3.7.8 Proteinkinasetest

Protein-Phosphorylierungsexperimente wurden wie für Cph1 beschrieben durchgeführt (Yeh *et al.*, 1997). Es wurden 25  $\mu\text{l}$  Ansätze bestehend aus Kinasepuffer, ATP-Mix mit radioaktiv markierten [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP und rekombinant gereinigtem Phytochrom verwendet. Holo-Phytochrom wurde entweder im Dunkeln, in der Pfr-Form nach 45 min Bestrahlung mit hellrotem Licht (630 nm) oder in der Pr-Form nach 30 min Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (750 nm) zu dem Ansatz pipettiert und anschließend 30 min bei RT unter den entsprechenden Lichtbedingungen inkubiert. Ein Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer. Nach SDS-PAGE (Kap. 3.7.1) und Übertragung der Proteinbanden auf eine PVDF-Membran im „Tank-Blot“-Verfahren (Kap. 3.7.2) erfolgte nach Auflegen einer Phosphor Image Platte (Kodak) die Auswertung am Phosphorimager (Molecular Imager FX).

#### 3.7.8.1 Lösungen für den Proteinkinasetest

5 × Kinasepuffer	Tris-HCl pH 7,7	125	mM
	EDTA	1	mM
	MgCl <sub>2</sub>	25	mM
	β-Mercaptoethanol	12	mM
5 × ATP-Mix	[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP	0,25	MBq
	ATP	2,5	mM
Ansatz (25 $\mu\text{l}$ )	5 × Kinasepuffer	5	$\mu\text{l}$
	5 × ATP-Mix	5	$\mu\text{l}$
	Phytochrom	1	$\mu\text{g}$
	mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> auffüllen auf 25 $\mu\text{l}$		

### 3.7.9 Circulardichroismus-Spektroskopie (CD)

Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie, in der die durch eine optisch aktive Substanz verursachten unterschiedlichen Absorptionen von rechts- und links-zirkular-polarisiertem Licht gemessen werden.

Es wurden sowohl Spektren im Fern-UV-Bereich als auch Spektren im Bereich zwischen 250 und 800 nm aufgenommen. Im Fern-UV-Bereich (240 bis 180 nm) ist die Peptidbindung die absorbierende Gruppe und so können Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins gemacht werden. Im Nah-UV-Bereich (250 bis 350 nm) absorbieren die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, die durch die Tertiärstruktur des Proteins in asymmetrische Umgebung versetzt werden. Holo-BphP wurde gegen 10 mM Na-phosphat-Puffer (pH 7,0) dialysiert und es wurden in der Dunkel-, Pr- und Pfr-Form Spektren aufgenommen. Für Messungen im Fern-UV-Bereich lag die Proteinkonzentration bei 2  $\mu$ M und es wurden Quarzküvetten mit 1 mm Weglänge benutzt, wohingegen die Proteinkonzentration für Messungen in einem Wellenlängenbereich zwischen 300 nm und 800 nm bei 20  $\mu$ M lag und Küvetten mit 0,5 cm Weglänge benutzt wurden. Die Messungen erfolgten auf einem Jasco J-810 Spektropolarimeter.

### 3.7.10 Fluoreszenzspektroskopie

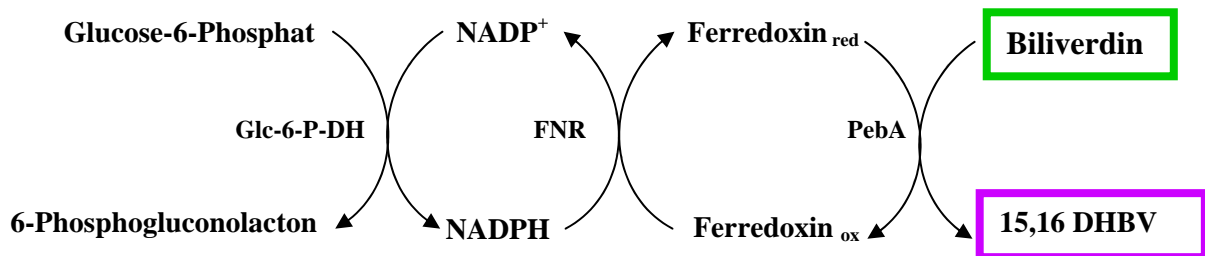
Um einen Komplex zwischen BphP und 15,16-Dihydrobiliverdin (DHBV) zu charakterisieren, wurde die Fluoreszenzspektroskopie angewandt. 2  $\mu$ M apo-BphP wurden mit ca. 4  $\mu$ M DHBV versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Fluoreszenzspektren wurden bei einer Anregung von 570 nm, dem Absorptionsmaximum von DHBV, aufgenommen oder bei einer Emissionswellenlänge von 630 nm verfolgt.

### 3.7.11 Synthese von 15,16-Dihydrobiliverdin (DHBV)

DHBV kann *in vitro* ausgehend von Biliverdin mit der ferredoxin-abhängigen Bilinreduktase PebA synthetisiert werden. Es wurde ein gekoppelter Enzymtest durchgeführt und die Reaktionsprodukte wurden mittels HPLC- Analyse überprüft (Frankenberg *et al.*, 2001).

Die Bilinreduktase PebA überträgt zwei Elektronen auf Biliverdin, wodurch 15,16-DHBV entsteht. Unter den im Enzymtest herrschenden Bedingungen werden diese Elektronen von einem „NADPH-regenerierenden System“ zur Verfügung gestellt. Das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glc-6-P-DH) entzieht seinem Substrat Glucose-6-Phosphat

Elektronen und überträgt diese auf  $\text{NADP}^+$ . Durch das Enzym FNR (Ferredoxin: $\text{NADP}^+$ :Oxidoreduktase) werden die Elektronen vom entstandenen NADPH auf Ferredoxin übertragen, welches seinerseits von PebA als Elektronenlieferant für die Reduktion von BV zu DHBV genutzt wird (Abb. 12).



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung des gekoppelten Enzymtests. Glc-6-P-DH, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; FNR, Ferredoxin: $\text{NADP}^+$ :Oxidoreduktase; PebA, 15,16-DHBV:Ferredoxin Oxidoreduktase.

Alle Komponenten (Kap. 3.7.11.1) wurden gemischt und die Reaktion durch Zugabe von BV gestartet. Der Enzymtest wurde für 30 min bei 30 °C im Dunkeln inkubiert und die Bildung von DHBV mittels HPLC überprüft.

### 3.7.11.1 Lösungen für gekoppelten Enzymtest

NADPH-regenerierendes System	Glucose-6-phosphat	6,5	mM
	$\text{NADP}^+$	0,82	mM
	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	1,1	U/ml
Ansatz (1 ml)	NADPH-reg. System	100	$\mu\text{l}$
	BSA (100 $\mu\text{M}$ )	100	$\mu\text{l}$
	FNR aus Spinat (2,5 U/ml)	10	$\mu\text{l}$
	Ferredoxin aus Spinat (10 mg/ml)	5	$\mu\text{l}$
	PebA	10	$\mu\text{M}$
	Biliverdin (in DMSO, 2 mM)	5	$\mu\text{l}$
	mit 25 mM TES-KOH pH 7,5 auffüllen auf 1 ml		



### 3.7.12 HPLC-Analyse

Die Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse erfolgte mittels C18 SepPak Light cartridges (waters Cat No.WAT023501), welche mit 3 ml Acetonitril, 3 ml H<sub>2</sub>O und 3 ml 50 mM N-Methylmorpholin pH 7,7 äquilibriert wurden. Die Probe wurde auf die SepPak-Säule aufgetragen, nach Waschen der Säule mit je 3 ml N-Methylmorpholin und 0,1 % TFA wurde das Produkt mit 2 ml Acetonitril von der Säule eluiert und der Ansatz bei RT in der Speedvac eingetrocknet.

Für die HPLC-Analyse (Gerät: Agilent Technologies, 1100 Series) diente eine Ultracarb 5- $\mu$ m ODS20 4,6 x 250-mm (Phenomenex) Säule. Es wurde eine Methode zur Auftrennung linearer Tetrapyrrole verwendet, bei der die Absorption bei 380 nm, 650 nm und 560 nm gemessen wurde, da BV bei 380 nm und 650 nm bzw. DHBV bei 560 nm absorbiert. Als Laufmittel diente Aceton:20 mM Ameisensäure (50/50 (v/v)), die Flussrate betrug 0,6 ml/min. Der getrocknete Ansatz wurde in 10  $\mu$ l DMSO resuspendiert, mit 200  $\mu$ l Laufmittel verdünnt, mittels eines 0,45  $\mu$ m-Polytetrafluorethylen Filters filtriert und 100  $\mu$ l auf die Säule aufgetragen.

## 3.8 Chemische Synthese der vier Biliverdinisomere

Die vier Biliverdinisomere IX $\alpha$ , IX $\beta$ , IX $\delta$  und IX $\gamma$  wurden durch eine gekoppelte Oxidation von Häm (Bonnett & McDonagh, 1973) synthetisiert. Eine durch Sauerstoff gekoppelte Oxidation von Häm und eines Reduktionsmittels wie Ascorbinsäure führt in Anwesenheit von Pyridin zur Bildung von Verdohemochrom, welches anschließend zu den vier Biliverdinisomeren hydrolysiert wird.

25 mg Häm (aus Rind) wurden in einem Gemisch aus 100 ml Pyridin und 300 ml H<sub>2</sub>O in einen Glaskolben (2 Liter) gegeben und 20 min mit Sauerstoff versetzt. Anschließend wurde der Sauerstoff über die Lösung gegeben, bei gedämpftem Licht 300 mg L-Ascorbinsäure schnell hinzugefügt und 6,5 min gerührt. Die so entstandene grüne Lösung wurde auf Eis in einen Kolben mit 100 ml Chloroform, welches vorher 5 min mit Stickstoff behandelt wurde, gegeben und in einem Scheidetrichter (1 Liter) ausgeschüttelt. Die untere grüne Chloroformphase wurde entfernt und die wässrige Phase noch einmal mit 30 ml Chloroform behandelt. Die vereinigten Chloroformphasen wurden mit 100 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, 5 min über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (wasserfrei) getrocknet, in einem Rotationsverdampfer bei RT bis zur Trockene eingengt und in 5 ml Chloroform gelöst. Dies wurde über Glaswolle filtriert, mit Stickstoff

bis zur Trockene eingengt, wiederum in 2 ml Chloroform gelöst und mit 20 ml Petroleumether versetzt. Der entstandene grüne Feststoff wurde durch Filtration gesammelt, in 1 ml Methanol, welches vorher entgast wurde, gelöst und mit 200 µl 2 N KOH in Methanol (entgast) versetzt. Die Mischung wurde mit Stickstoff behandelt, nach 2 min 458 µl Essigsäure (25 %) hinzugefügt und nach 1 min Stickstoffbehandlung wurde das Gemisch über Glaswolle filtriert und 10-fach mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) versetzt.

### 3.8.1 HPLC-Analyse

Die Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse erfolgte mittels C18 SepPak Light cartridges (waters Cat No. WAT023501), welche mit 3 ml Acetonitril, 3 ml H<sub>2</sub>O, 3 ml 0,1 % TFA, 3 ml 10 % Methanol in 0,1 % TFA, 3 ml Acetonitril, 3 ml H<sub>2</sub>O und 3 ml 10 % Methanol in 0,1 % TFA äquilibriert wurden. Die Probe wurde 10-fach mit 0,1 % TFA verdünnt und auf die SepPak-Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 6 ml 0,1 % TFA und 6 ml aus einem Gemisch von Acetonitril mit 0,1 % TFA (Verhältnis 20 : 80) wurde das Produkt mit 2 ml Acetonitril von der Säule eluiert und der Ansatz bei RT in der Speedvac eingetrocknet.

Zur Auftrennung der Biliverdinisomere diente eine semi-präparative HPLC-Säule (Ultracarb 5-µm ODS20 10 x 250-mm (Phenomenex)) und die Flussrate lag bei 2 ml/min. Die verwendete Methode ist in Kapitel 3.7.12 beschrieben.

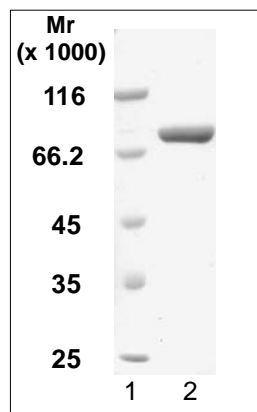
## 3.9 Bioinformatische Methoden

Aminosäuresequenz-Alignments und ein phylogenetischer Stammbaum wurden mit dem Lasergene Software-Paket v. 6 (DNASar, Madison, Wisconsin) und der ClustalW Methode erstellt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Rekombinante Produktion und Reinigung von BphP aus *Pseudomonas aeruginosa*

Zur Expression von *P. aeruginosa bphP* wurde das C-terminale Strep-tag Expressionssystem der Firma IBA genutzt, welches unter der Kontrolle eines *tet*-Promotors steht. Es wurde sowohl apo-BphP als auch holo-BphP hergestellt. Für die Produktion von holo-BphP wurde ein zwei-Plasmidsystem verwendet, wie es bereits für die Produktion von holo-Cph1 beschrieben wurde (Gambetta & Lagarias, 2001). Im Gegensatz zur holo-Cph1 Produktion wurde jedoch nicht das Plasmid pAT 103 (Tooley *et al.*, 2001) verwendet, sondern das Plasmid pAT-BV. Hierbei handelt es sich um ein pAT 103-Derivat, welches nur noch das Hämoxygenasegen *ho1* aus *Synechocystis* sp. PCC6803 enthält und somit zur Produktion von BV verwendet werden kann.



**Abbildung 13:** SDS – PAGE Analyse von *PaBphP* nach Anionenaustauschchromatographie an einer HiTrap<sup>TM</sup>Q-Sepharose HP Säule. Die Proteine wurden über ein 10 %iges SDS-Gel getrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau-Färbung visualisiert.

Bahn 1: Proteinstandard (Protein Molecular Weight Marker)

Bahn 2: gereinigtes *PaBphP*

Die einzelnen Reinigungsschritte wurden sowohl für apo- als auch für holo-BphP wie im Methodenteil (Kap. 3.6.1 ) beschrieben durchgeführt.

Nach dem Zellaufschluß mittels Ultraschall folgte eine Ammoniumsulfatfällung, wobei *PaBphP* bei einer  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration von 40 % präzipitierte. Die

säulenchromatographische Reinigung von *PaBphP* erfolgte durch Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose und anschließender Anionenaustauschchromatographie mittels einer HiTrap™Q-Sepharose HP Säule in einem linearen Gradienten von 0,2 mM – 1 M KCl. *PaBphP* eluierte bei einer KCl-Konzentration von ca. 500 mM.

Die Homogenität von *PaBphP* nach der Reinigung lag bei ca. 98 %. Im SDS-Gel (Abb. 13) ist eine einzelne Bande bei ca. 80.000 zu erkennen, was der für *PaBphP* anhand der Aminosäurezusammensetzung berechneten molekularen Masse von 80.100 entspricht. Die Gesamtmenge an gereinigtem *PaBphP* lag bei 5 mg pro Liter Zellkultur. Interessanterweise war das Protein wie auch die Zellen bei der Holo-Phytochrom-Produktion grün gefärbt, was auf das Vorhandensein von BV hinweist. Obwohl durch eine Holo-Phytochrom-Produktion die Gesamtausbeute an Protein aufgrund der stabilisierenden Wirkung des Chromophors deutlich höher sein sollte (Gambetta & Lagarias, 2001), konnte die Ausbeute an holo-BphP im Vergleich zu apo-BphP nicht gesteigert werden.

## **4.2 Rekombinante Produktion und Reinigung von FphA aus *Aspergillus nidulans***

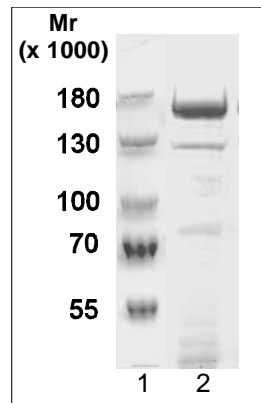
Zur Expression von *A. nidulans fphA* wurde ebenfalls das Strep-tag Expressionssystem der Firma IBA genutzt. Es wurde nur holo-FphA hergestellt, wobei auch hier ein zwei-Plasmidsystem aus pASK-*fphA* und pAT-BV verwendet wurde. Bei der Expression von apo-FphA war es nicht möglich, lösliches Protein zu erhalten, was auf die stabilisierende Wirkung des Chromophors während oder unmittelbar nach der Translation hinweist (Gambetta & Lagarias, 2001).

Die einzelnen Reinigungsschritte wurden wie im Methodenteil beschrieben (Kap. 3.6.2) durchgeführt.

Nach dem Zellaufschluß mittels Ultraschall folgte die säulenchromatographische Reinigung von FphA durch Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose. In den FphA enthaltenden Fraktionen befanden sich noch Verunreinigungen durch ebenfalls an Streptactin-Sepharose bindende Proteine.

Zur Abtrennung der Verunreinigungen wurde eine Gelpermeationschromatographie an Superdex 200 HR 10/30 durchgeführt. Im SDS-Gel ist eine Bande bei ca. 146.000 zu erkennen, was der berechneten molekularen Masse von 146.200 entspricht. Das Protein lag jedoch nicht 100 %ig homogen vor (Abb. 14). Die Gesamtmenge an Protein lag bei ca. 0,3

mg pro Liter Bakterienkultur. Diese niedrige Ausbeute liegt wahrscheinlich an dem Expressionsstamm *E. coli*, in dem eukaryotische Gene nur schlecht exprimiert werden. Somit sind weitere Studien in anderen Expressionssystemen wie z.B. in Hefe oder in *A. nidulans* notwendig, um die Ausbeute möglichst zu erhöhen.



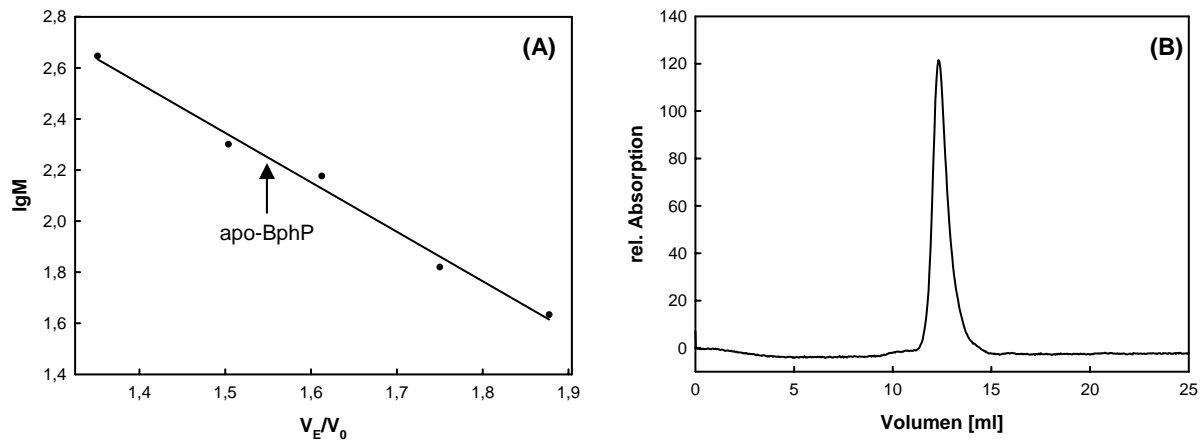
**Abbildung 14:** SDS – PAGE Analyse von FphA nach Gelfiltration an einer Superdex 200 HR 30/10. Die Proteine wurden über ein 7,5 %iges SDS-Gel getrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau-Färbung visualisiert.  
Bahn 1: Proteinstandard (Prestained Protein Ladder)  
Bahn 2: Fraktion nach der Elution

### 4.3 Analytische Gelpermeationschromatographie (GPC)

Zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von apo- und holo-BphP (Pr- und Pfr-Form) wurde analytische GPC angewandt. Sowohl apo- als auch holo-BphP eluierten als Dimer mit einer molekularen Masse von 160.000 von einer Superdex 200 HR 10/30 Säule, was anhand einer mit Molekulargewichts-Standards erstellten Eichgeraden (Abb. 15A) berechnet wurde. Im Elutionsvolumen war kein Unterschied zwischen apo- (Abb. 15B) und assemblierten holo-BphP zu erkennen.

Auch das Verhalten der Pr- und Pfr-Form war identisch. Im Vergleich dazu wurde für Cph1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unterschiedliches Laufverhalten beobachtet. Apo-Cph1 ist ein Monomer, während holo-Cph1 Dimere ausbildet (Lamparter *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2000), wobei die Pfr-Form zusätzlich leicht höhere Mobilität als die Pr-Form zeigt (Lamparter *et al.*, 2001). Dies weist auf eine Konformationsänderungen im Protein während der Photokonversion hin. Im Gegensatz zu PaBphP stimuliert hier die Bilinbindung die Bildung

von Cph1-Dimeren, was wiederum für die Aktivität der Histidinkinasedomäne (HKD) notwendig ist, deren Mechanismus über Transphosphorylierung verläuft (Stock *et al.*, 1995).

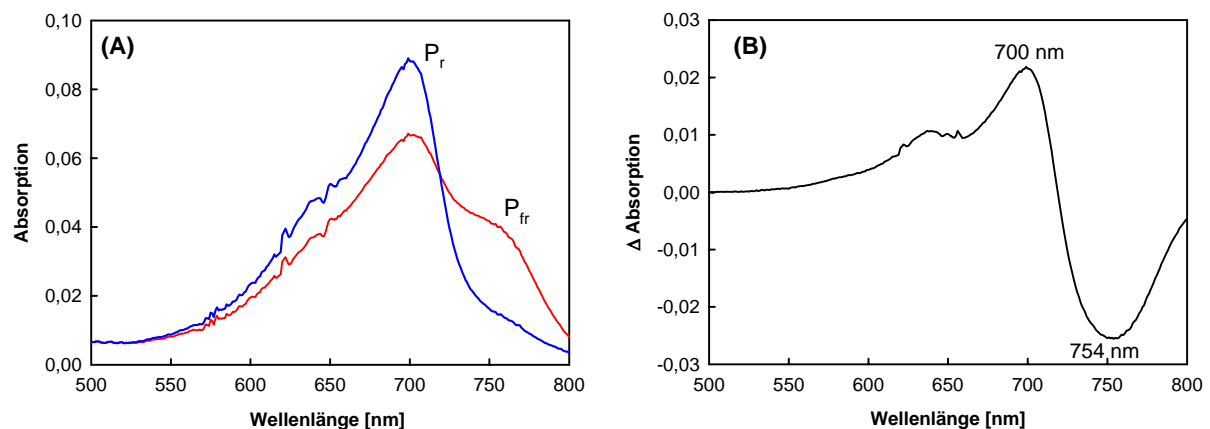


**Abbildung 15:** (A) Eichgerade (Superdex 200 HR 10/30 Säule) mit folgenden Molekulargewichts-Standards: Apoferritin 443.000;  $\beta$ -Amylase 200.000; Alkoholdehydrogenase 150.000; Ovalbumin 45.000; Carboanhydrase 29.000. Aufgetragen wurde der Logarithmus der Mr gegen den Quotienten aus Elutionsvolumen der einzelnen Markerproteine und  $V_0$  (= 8 ml). (B) Chromatogramm der GPC von apo-BphP (100  $\mu$ M) an der Superdex 200 HR 10/30 Säule.

## 4.4 Assemblierung und Chromophorbindung

*PaBphP* bzw. *FphA* sind in der Lage, mit dem wahrscheinlich natürlichen Chromophor BV IX $\alpha$  in einer autokatalytischen Reaktion photokonvertierbares holo-Phytochrom zu bilden.

Da in *P. aeruginosa* das Gen *bphP* in einem Operon mit dem hämoxygenasecodierenden Gen *bphO* vorliegt, wird vermutet, dass BV IX $\alpha$  der natürliche Chromophor von *PaBphP* ist. Bestrahlung von mit BV IX $\alpha$  assemblierten BphP mit hellrotem Licht (630 nm) führte zur Bildung der Pfr-Form mit einem Absorptionsmaximum bei 754 nm. Diese Form enthielt noch Anteile der Pr-Form, d.h. es handelte sich um eine Pfr-angereicherte Form. Die Pfr-angereicherte Form konnte nach Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (750 nm) in die Pr-Form mit einem Absorptionsmaximum bei 700 nm umgewandelt werden (Abb. 16A). Das aus diesen Absorptionsspektren kalkulierte Differenzspektrum (Pr-Pfr) (Abb. 16B) ist charakteristisch für Phytochrome.



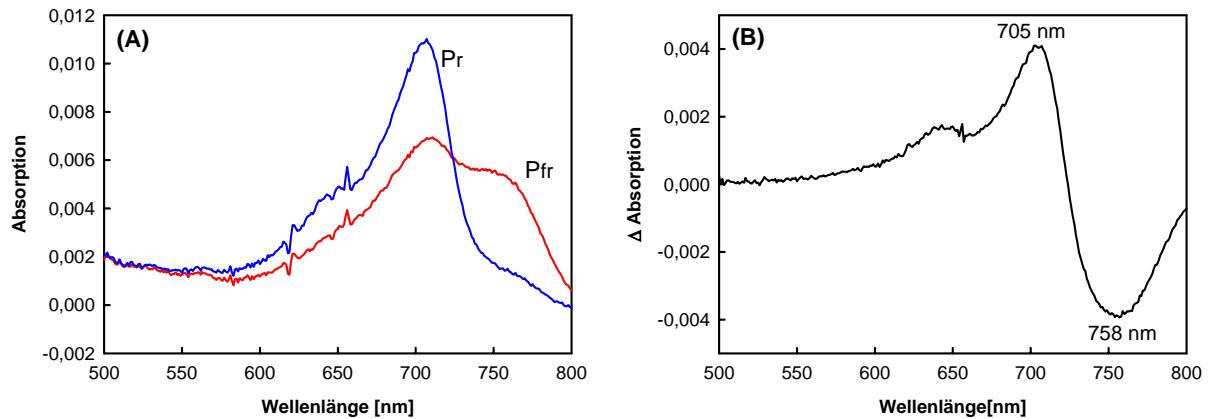
**Abbildung 16:** (A) Absorptionsspektren von rekombinant gereinigtem apo-BphP inkubiert mit BV IX $\alpha$ . Pfr- bzw. Pfr-angereicherte Form nach Bestrahlung mit hellrotem Licht (630 nm) (rote Linie); Pr-Form nach Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (750 nm) (blaue Linie); (B) Berechnetes Pr-Pfr-Differenzspektrum.

Auch rekombinantes FphA assemblierte BV IX $\alpha$  und reagierte auf rotes bzw. dunkelrotes Licht. Nach Bestrahlung mit hellrotem (630 nm) und anschließender Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (750 nm) erhielt man ein typisches Phytochrom-Differenzspektrum (Abb. 17) und die Absorptionsmaxima lagen für das Pr-Spektrum bei 705 nm, für das Pfr-angereicherte Spektrum bei 758 nm. Dies und die Tatsache, dass der Domänenaufbau in FphA mit einem konservierten Cysteinrest in der N-terminalen PAS-Domäne dem von BV-bindenden Bphs ähnelt, weist auf BV IX $\alpha$  als natürlichen Chromophor von FphA hin. Obwohl bis jetzt kein Gen in *A. nidulans* identifiziert wurde, welches für eine Hämoxygenase codiert, ist *A. nidulans* wahrscheinlich in der Lage lineare Tetrapyrrole zu produzieren. Die Identifizierung eines hämoxygenasecodierenden Gens im Genom von *A. nidulans* wird erschwert durch die sehr niedrige Homologie zwischen Hämoxygenasen (Wilks, 2002). Möglicherweise wird die Bildung von BV aber auch von einem „neuen“ Enzym katalysiert, wie es z.B. für *Staphylococcus aureus* gezeigt werden konnte (Skaar *et al.*, 2004a).

Eine kovalente Bindung von BV IX $\alpha$  an PaBphP und FphA wurde mittels Zink-induzierter roter Fluoreszenz nachgewiesen (Abb. 19, Abb. 22).

Im Vergleich zu Differenzspektren pflanzlicher Phytochrome mit einem Absorptionsmaximum bei 666 nm und einem Minimum bei 730 nm oder cyanobakterieller Phytochrome mit 654 nm und 706 nm weisen die Absorptionsextrema in den Differenzspektren von holo-BphP und holo-FphA eine Rotverschiebung auf. Diese

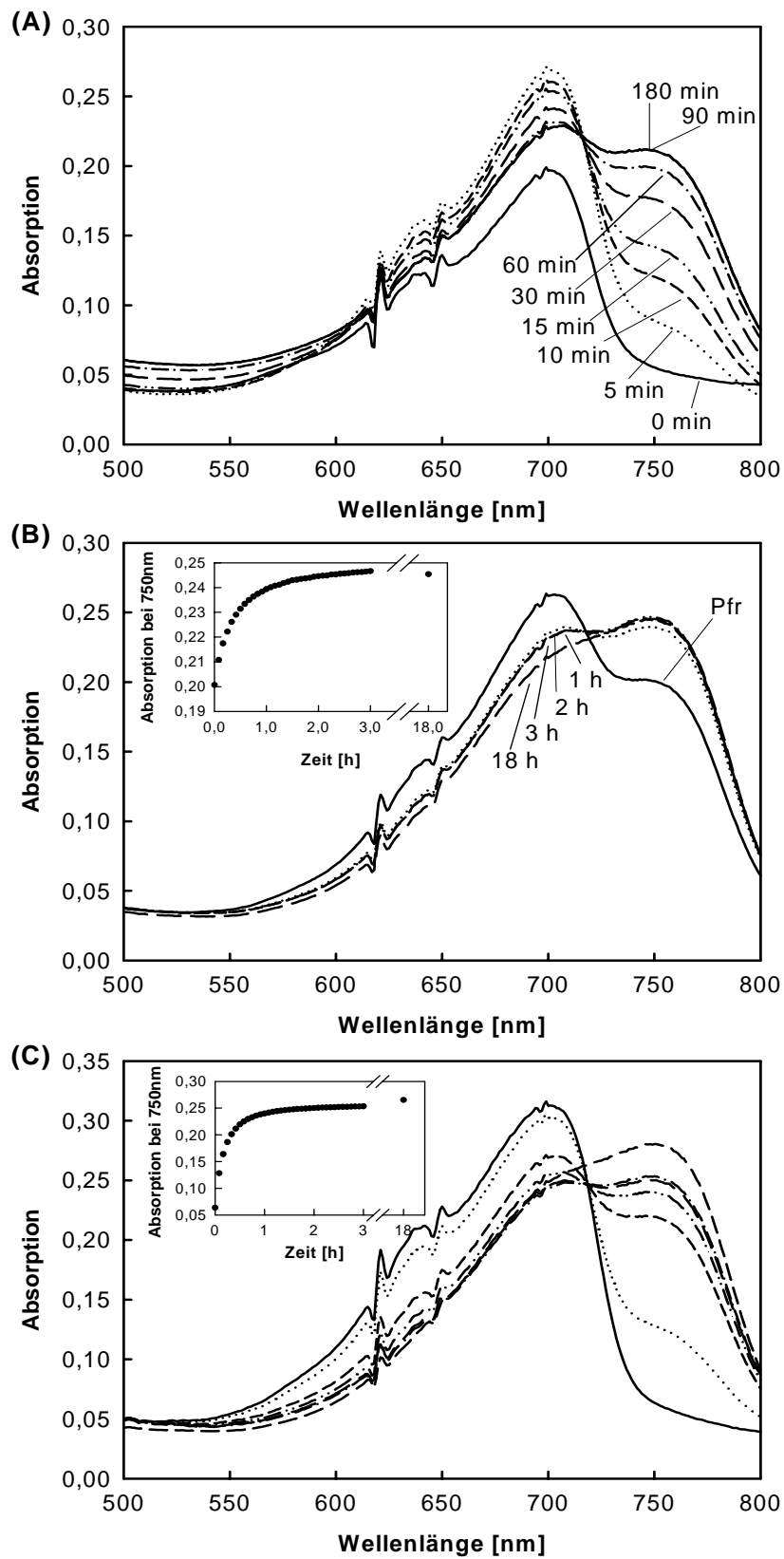
Rotverschiebung ist die stärkste, die bis jetzt beschrieben wurde (Giraud *et al.*, 2002; Lamparter *et al.*, 2002) und scheint typisch für Biliverdin-bindende Phytochrome zu sein. BV hat im Vergleich zu P $\Phi$ B und PCB, den Chromophoren pflanzlicher bzw. cyanobakterieller Phytochrome, ein ausgeprägteres  $\pi$ -Elektronensystem (Abb. 3) (Bhoo *et al.*, 2001; Karniol & Vierstra, 2003; Lamparter *et al.*, 2002).



**Abbildung 17:** (A) Absorptionsspektren von rekombinantem holo-FphA mit BV IX $\alpha$ . Pfr- bzw. Pfr-angereicherte Form nach Bestrahlung mit hellrotem Licht (630 nm) (rote Linie); Pr-Form nach Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (750 nm) (blaue Linie); (B) Berechnetes Pr-Pfr-Differenzspektrum.

Direkt nach der Zugabe von BV IX $\alpha$  zu apo-BphP wurde im Dunkeln die Pr-Form gebildet, welche sofort nicht-photochemisch in die Pfr-angereicherte Form umgewandelt wurde. Nach ca. 90 min stellte sich ein Gleichgewicht zwischen Pr- und Pfr-angereicherter Form ein (Abb 18A). Im Gegensatz zu den meisten Mitgliedern der Phytochrom-Familie, welche im Grundzustand in der Pr-Form vorliegen (Montgomery & Lagarias, 2002; Smith, 2000), ist der Grundzustand von *PaBphP* die Pfr-angereicherte Form.





**Abbildung 18:** Spektrale Eigenschaften von holo-BphP. (A) Änderung des Absorptionsspektrums nach Assemblierung von apo-BphP mit BV IX $\alpha$  während einer 3-stündigen Inkubation im Dunkeln; (B) Dunkelreversion von holo-BphP in der Pfr-Form; (C) Dunkelreversion von holo-BphP in der Pr-Form;

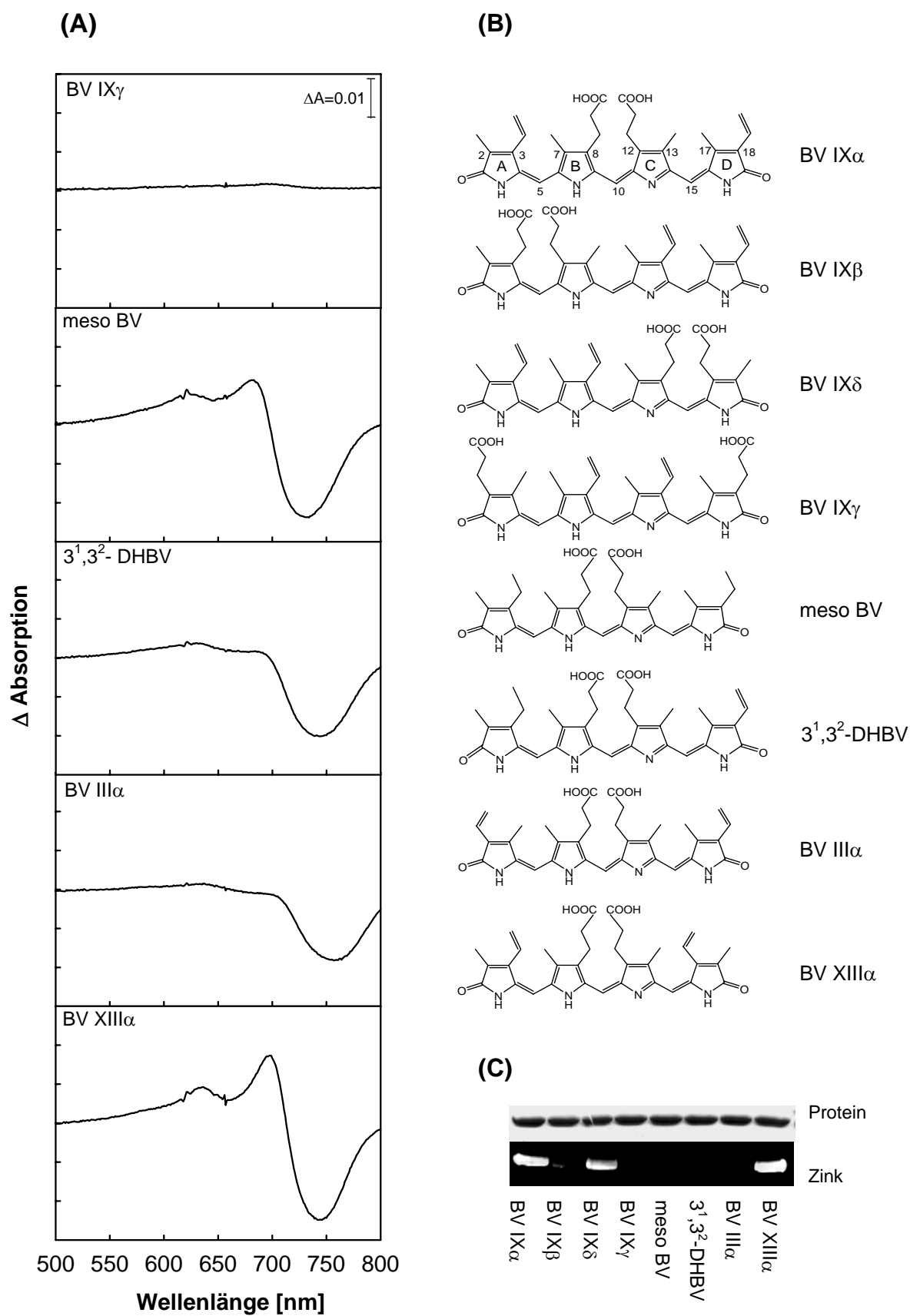
Ein Pfr-Grundzustand wird auch in Phytochrom aus *Bradyrhizobium*, *Rhodospseudomonas palustris* und Agp2 aus *A. tumefaciens* beobachtet (Giraud *et al.*, 2002; Karniol & Vierstra, 2003). Die Rolle dieses gegensätzlichen Grundzustandes ist noch nicht geklärt. In den anoxygenen photosynthetischen Bakterien könnte der Pfr-Grundzustand für die Regulation des Photosyntheseapparates notwendig sein, da das Absorptionsspektrum nicht mit dem Absorptionsspektrum von Chlorophyll überlappt (Giraud *et al.*, 2002). Die Funktion des Pfr-Grundzustandes in Agp2 oder PaBphP ist nicht bekannt. Falls PaBphP in *P. aeruginosa* die Funktion eines Photorezeptors hat, könnte er als Sensor für das Verhältnis zwischen dunkelrotem und rotem Licht dienen.

Bestrahlung der Pfr-angereicherten Form mit dunkelrotem Licht (750 nm) führte zur Bildung der Pr-Form, welche wiederum durch Bestrahlen mit hellrotem Licht in die Pfr-angereicherte Form umgewandelt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Sowohl die Pr- als auch die Pfr-angereicherte Form waren im Dunkeln instabil. Sie unterlagen einer Dunkelreversion und gingen beide in eine Dunkelform über, einer Pfr-angereicherten Form mit hohem Pfr-Anteil (Abb. 18B,C). Dunkelreversion von der Pr- und Pfr-Form zu einer Pfr-angereicherten Form wurde auch für Agp2 beschrieben (Karniol & Vierstra, 2003).

## 4.5 Chromophor-Protein-Interaktion

Um zu überprüfen, welcher Teil des Chromophors an der Bindung zum Protein beteiligt ist und ob es sich um eine kovalente Bindung handelt, wurden Untersuchungen mit verschiedenen Biliverdinisomeren durchgeführt.

Mit den Biliverdin-Isomeren BV IX $\delta$  (Abb. 36D) und BV XIII $\alpha$  (Abb. 19A) war PaBphP in der Lage, photokonvertierbares holo-Phytochrom zu bilden und mittels Zink-induzierter Fluoreszenz konnte eine kovalente Bindung zwischen diesen Isomeren und dem Protein nachgewiesen werden (Abb. 19C). Im Gegensatz dazu konnten mit den BV-Isomeren BV IX $\beta$  (Abb. 36D), BV IX $\gamma$ , meso-BV, 3<sup>1</sup>,3<sup>2</sup>-Dihydrobiliverdin und BV III $\alpha$  weder charakteristische Differenzspektren gemessen noch eine kovalente Bindung gezeigt werden. Die spektralen Eigenschaften sind in Tabelle 6 zusammengefasst.



**Abbildung 19:** (A) Differenzspektren von apo-BphP inkubiert mit unterschiedlichen BV-Isomeren. Von oben nach unten: Differenzspektrum mit BV IX $\gamma$ , 3<sup>1</sup>,3<sup>2</sup>-Dihydrobiliverdin, Biliverdin III $\alpha$ , Biliverdin XIII $\alpha$ . Spektrum mit BV IX $\alpha$  s. Abb.16, mit BV IX $\delta/\beta$  s. Abb. 33. (B) Strukturen der BV-Isomere. (C) Zink-induzierte rote Fluoreszenz von apo-BphP inkubiert mit verschiedenen BV-Isomeren.

**Tabelle 6:** Spektrale Eigenschaften von *PaBphP* inkubiert mit verschiedenen BV-Isomeren.

	$\lambda (\Delta A_{\max})$ [nm]	$\lambda (\Delta A_{\min})$ [nm]	$\Delta A_{\max}$	$\Delta A_{\min}$	$\Delta\Delta A$
<b>BV IX<math>\alpha</math></b>	700	754	0,022	-0,026	0,048
<b>BV III<math>\alpha</math></b>	-	757	0,000	-0,009	0,009
<b>BV XIII<math>\alpha</math></b>	700	746	0,009	-0,012	0,021
<b>BV IX<math>\delta</math></b>	700	756	0,003	-0,004	0,008
<b>BV IX<math>\beta</math></b>	-	-	-	-	-
<b>BV IX<math>\gamma</math></b>	-	-	-	-	-
<b>3,3'-DHBV</b>	-	743	0,000	-0,010	0,010
<b>mesoBV</b>	683	734	0,006	-0,012	0,018

Die Gemeinsamkeit der BV-Isomere, die in der Lage sind eine kovalente Bindung mit *PaBphP* zu knüpfen bzw. mit denen charakteristische Differenzspektren gemessen wurden, ist eine Endo-Vinylgruppe am A-Ring (Abb. 19B), was darauf hinweist, dass diese Seitengruppe des BV für eine kovalente Bindung notwendig ist. Eine kovalente Bindung zwischen der Endo-Vinylgruppe am A-Ring und dem Protein wurde auch schon für Agp1 aus *A. tumefaciens* beschrieben (Lamparter *et al.*, 2003).

## 4.6 Charakterisierung der Chromophor-Bindestelle

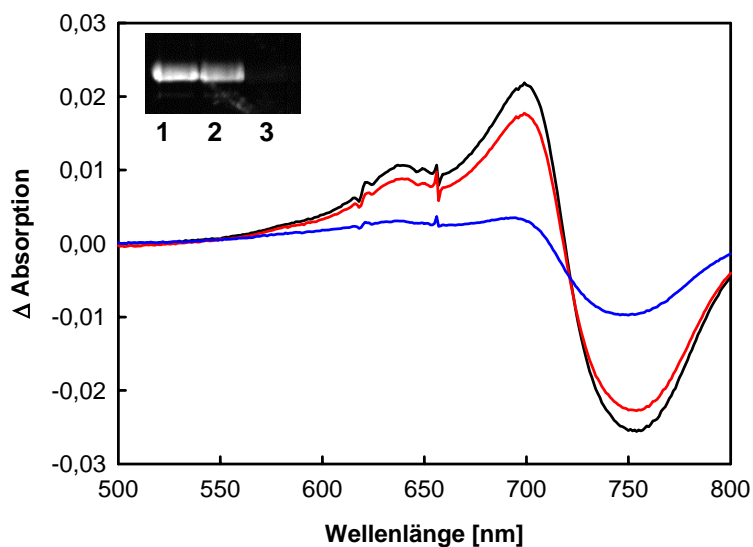
Sowohl in *PaBphP* als auch in FphA fehlt der konservierte Cysteinrest in der GAF-Domäne, an dem der Chromophor in Pflanzen und den meisten Cyanobakterien kovalent gebunden wird. Stattdessen befindet sich ein konservierter Cysteinrest in der P2-Domäne, an den z.B. in Agp1 aus *A. tumefaciens* BV kovalent über eine Thioetherbindung verknüpft wird (Lamparter *et al.*, 2002). Um zu bestimmen, welcher Rest die Chromophorbindestelle in *PaBphP* und FphA darstellt, wurden verschiedene Varianten hergestellt und charakterisiert. Für *PaBphP* wurden sowohl Varianten hergestellt, in denen der konservierte Cysteinrest in der P2-Domäne ausgetauscht wurde (BphP C12A, BphP C12S) wie auch Varianten in denen Aminosäuren in der GAF-Domäne ausgetauscht wurden, die mögliche Chromophorbindestellen sein könnten. Es wurde ein Histidin- und ein Cysteinrest ausgetauscht, welche der Chromophorbindestelle in Pflanzen und Cyanobakterien direkt

benachbart sind (BphP H247Q, BphP C248A). Dieser Histidinrest wurde für *Calothrix* sp. PCC7601 CphB und *D. radiodurans* BphP als mögliche Chromophorbindestelle diskutiert (Davis *et al.*, 1999b; Quest & Gartner, 2004). Für *D. radiodurans* konnte gezeigt werden, dass ein Cystein in der N-terminalen PAS-Domäne die Chromophorbindestelle ist (Wagner *et al.*, 2005).

Für FphA wurde eine Variante charakterisiert, bei der das konservierte Cystein in der P2-Domäne ausgetauscht wurde (FphA C195A).

#### 4.6.1 Modifizierung mit Iodacetamid

Apo-BphP wurde mit Iodacetamid (IAA) behandelt, um zu bestimmen, ob BV an einem Cysteinrest über eine Thioetherbindung oder an einer anderen Aminosäure wie z.B. Histidin über eine Schiff-Base gebunden wird. IAA ist ein Reagens, welches spezifisch Cysteinreste blockiert. Falls ein Chromophor-bindendes Cystein für IAA zugänglich ist, wird eine anschließende Chromophorbindung verhindert.



**Abbildung 20:** Differenzspektroskopie nach Blockierung von apo-BphP mit Iodacetamid (IAA). Apo-BphP wurde ohne (schwarz), mit 0,1 mM (rot) und 1 mM (blau) Iodacetamid inkubiert und anschließend wurden Differenzspektren mit BV IX $\alpha$  aufgenommen. (Insert: Zink-induzierte rote Fluoreszenz: 1, ohne IAA; 2, 0,1 mM IAA; 3, 1 mM IAA).

Die Zugabe einer steigenden Konzentration von IAA zu apo-BphP führte nach anschließender Assemblierung mit BV IX $\alpha$  zu einer reduzierten Photoisomerisierung. In Abbildung 20 ist

eine Abnahme des Differenzspektrums mit Zunahme der Iodacetamidkonzentration zu erkennen. Auch die kovalente Bindung des Chromophors wurde beeinflusst, was an der reduzierten Zink-induzierten roten Fluoreszenz deutlich wird (Abb. 20, Insert). Eine vollständige Inhibierung der Chromophorbindung wurde bei einer Konzentration von 1 mM IAA beobachtet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Chromophor höchst wahrscheinlich an einem Cysteinrest bindet. In BphP gibt es insgesamt zwölf Cysteinreste, wobei für zehn von diesen durch Mutationsanalysen gezeigt werden konnte, dass diese nicht an der Chromophorbindung beteiligt sind (Benkartek, 2005). Die zwei restlichen Cysteinreste, die möglicherweise den Chromophor binden, sind ein Cystein an der Position 12, welche sich in der P2-Domäne befindet und ein Cystein an der Position 248, welche in der GAF-Domäne lokalisiert ist.

#### 4.6.2 Differenzspektroskopie und Zink-induzierte rote Fluoreszenz verschiedener Phytochrom-Varianten

##### BphP aus *P. aeruginosa*:

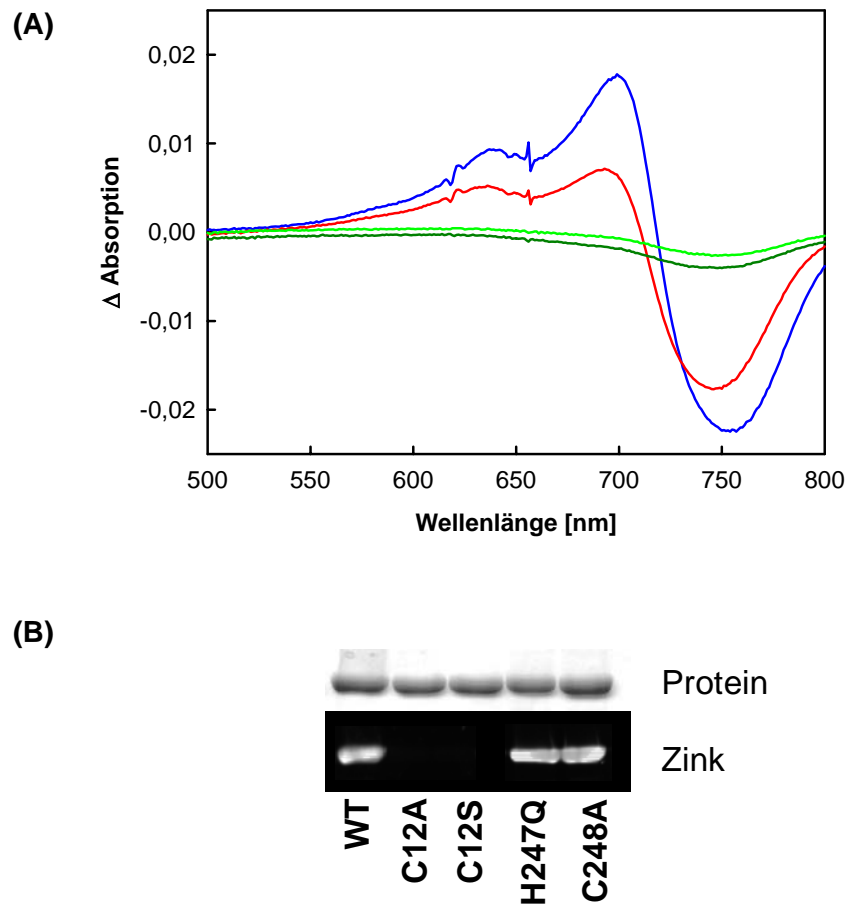
Es wurden Differenzspektren mit den *Pa*BphP-Varianten C12A, C12S, H247Q und C248A aufgenommen.

Weder die Variante BphP C12A noch die Variante BphP C12S zeigten charakteristische Differenzspektren (Abb. 21). Die Differenzspektren dieser Varianten ähnelten den Spektren des Wildtyps, welche nach Blockierung mit IAA aufgenommen wurden (Abb. 20). Die Variante C248A war in der Lage photokonvertierbares holo-Phytochrom zu bilden und es war kein Unterschied zum Spektrum des Wildtyps zu erkennen. Die Variante BphP H247Q bildete photokonvertierbares holo-Phytochrom, wobei die Absorptionsmaxima im Vergleich zum Wildtypspektrum eine leichte Blauverschiebung zeigten. Dies deutet auf eine Beteiligung des Histidinrestes bei der Chromophorbindung hin. Die spektralen Eigenschaften der BphP-Varianten nach Assemblierung mit BV IX $\alpha$  sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7:** Spektrale Eigenschaften der BphP-Varianten assembliert mit BV IX $\alpha$ .

	Max. [nm]	Min. [nm]
<b>WT</b>	700	754
<b>C248A</b>	700	754
<b>H247Q</b>	694	746
<b>C12A</b>	-	750
<b>C12S</b>	-	750

Eine kovalente Bindung von BV IX $\alpha$  an das Protein konnte wie für den Wildtyp auch für die Varianten C248A und H247Q mittels Zink-induzierter roten Fluoreszenz nachgewiesen werden, nicht aber für die Varianten C12A und C12S (Abb. 21B). Diese Daten zeigen, dass der Cysteinrest 12, welcher in der P2-Domäne lokalisiert ist, wichtig für die kovalente Bindung des Chromophors ist.

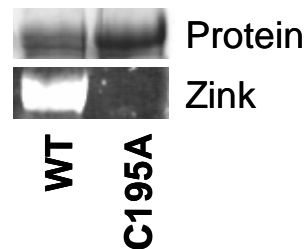


**Abbildung 21:** (A) Absorptions-Differenzspektren verschiedener apo-BphP-Varianten mit BV IX $\alpha$ . Differenzspektrum von C248A (blau), H247Q (rot), C12A (dunkelgrün) und C12S (hellgrün). (B) Zink-induzierte rote Fluoreszenz von apo-BphP-Varianten mit BV IX $\alpha$ .

#### FphA aus *A. nidulans*:

Auch bei der Charakterisierung der FphA-Variante C195A wurde eine wichtige Rolle des konservierten Cysteins in der N-terminalen PAS-Domäne beobachtet. Diese Variante war weder in der Lage photokonvertierbares holo-Phytochrom zu bilden (Daten nicht gezeigt),

noch konnte mittels Zink-induzierter roten Fluoreszenz eine kovalente Bindung des Chromophors nachgewiesen werden (Abb. 22).

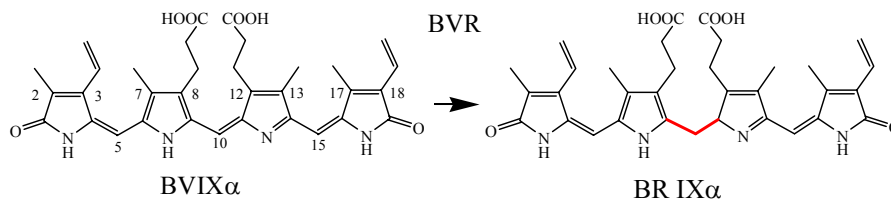


**Abbildung 22:** Zink-induzierte rote Fluoreszenz von FphA Wildtyp und der FphA-Variante C195A mit BV IX $\alpha$ .

Sowohl im *P. aeruginosa* Phytochrom BphP als auch im *A. nidulans* Phytochrom FphA ist ein konservierter Cysteinrest in der P2-Domäne an der Chromophorbinding beteiligt.

#### 4.6.3 Biliverdinreduktasetest

Zur weiteren Charakterisierung einer kovalenten Bindung des Chromophors BV an *PaBphP* Wildtyp bzw. der BphP-Varianten diente ein Biliverdinreduktasetest. In diesem Test wird freies BV IX $\alpha$  durch das Enzym Biliverdinreduktase (BVR) in Bilirubin (BR) umgesetzt (Abb. 23), welches man durch die Absorption bei 450 nm nachweisen kann. Bei einer kovalenten Bindung von BV IX $\alpha$  an das Phytochrom sollte somit keine Umsetzung zu BR erfolgen.

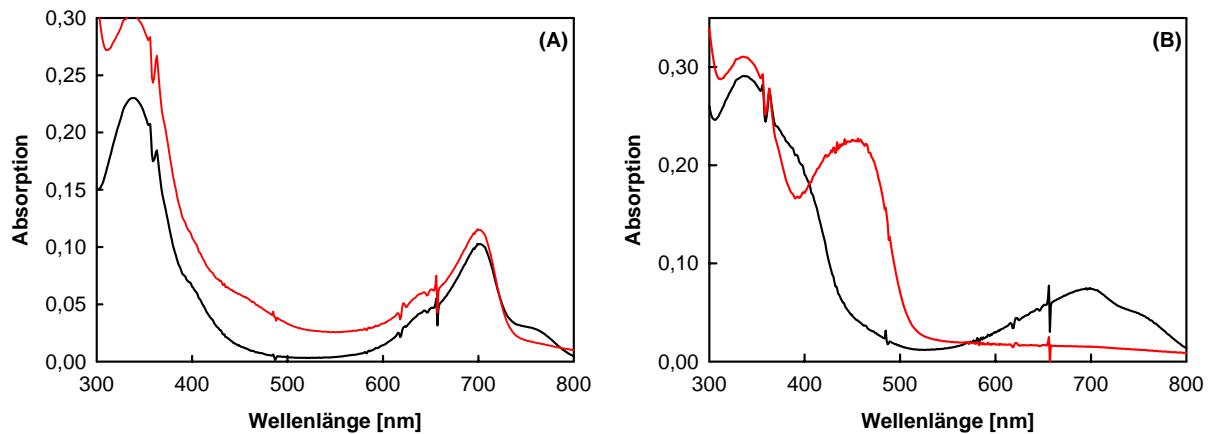


**Abbildung 23:** Umsetzung von Biliverdin (BV IX $\alpha$ ) zu Bilirubin (BR IX $\alpha$ ) durch das Enzym Biliverdinreduktase (BVR).

Die Zugabe von rekombinanter BVR und NADPH zu einem Komplex aus BphP C12A:BV (Abb. 24B) und C12S:BV (ohne freies BV) führte zu einer Umsetzung des gebundenen



Biliverdins zu Bilirubin, was an einer Farbänderung von grün nach orange deutlich wurde. BV ist somit in den Varianten BphP C12A und C12S nicht kovalent an dem Protein gebunden. Im Gegensatz dazu fand mit den Komplexen BphP WT:BV (Abb. 24A), H247Q:BV und C248A:BV nach BVR-Zugabe keine Umsetzung zu BR statt, was auf eine kovalente Bindung des BV hinweist.



**Abbildung 24:** Biliverdinreduktasetest. (A) WT; Test ohne Zugabe von BVR (schwarz), 30 min nach Zugabe von BVR (rot) (B) C12A; Test ohne Zugabe von BVR (schwarz), 5 min nach Zugabe von BVR (rot).

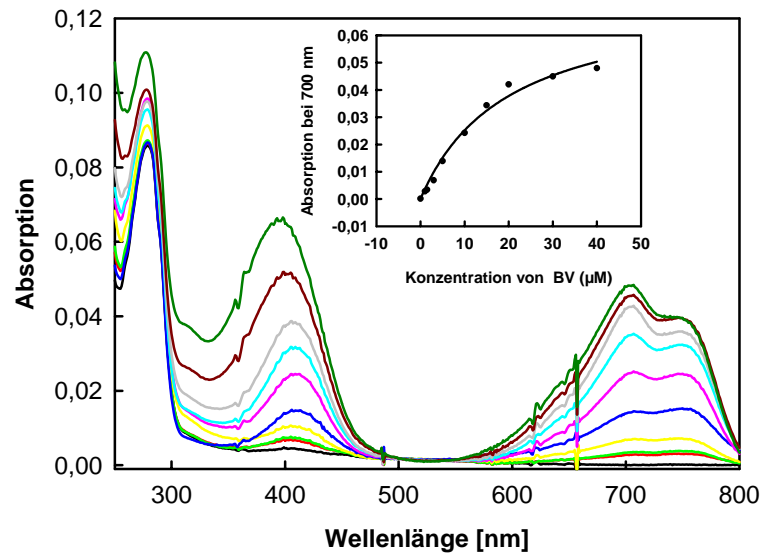
#### 4.6.4 Bestimmung eines Affinitätskoeffizienten ( $K_{„a“}$ )

Um die Affinität von BV IX $\alpha$  an das Phytochrom aus *P. aeruginosa* zu ermitteln, wurden Bindungsstudien sowohl für den Wildtyp als auch für die Varianten durchgeführt.

Die Affinitätskoeffizienten ( $K_{„a“}$ ) der Varianten BphP C248A und BphP H247Q lagen in der Größenordnung des Affinitätskoeffizienten, der für den Wildtyp (Abb. 25) ermittelt wurde. Im Gegensatz dazu waren die Koeffizienten für die Varianten BphP C12A und BphP C12S 6-fach höher, was wiederum anzeigt, dass in diesen Varianten die Bindung zwischen Chromophor und Protein sehr viel schwächer ist und der Cysteinrest 12 eine Rolle bei der festen Bindung des Chromophors spielt. Die Affinitätskoeffizienten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8:**  $K_{\text{a}}$ -Werte von BphP WT und Varianten in  $\mu\text{M}$ . Die Werte wurden anhand der Absorption bei 700 nm berechnet.

	$K_{\text{a}}$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]
<b>BphP WT</b>	20
<b>BphP C248A</b>	27
<b>BphP H247Q</b>	38
<b>BphP C12S</b>	145
<b>BphP C12A</b>	134



**Abbildung 25:** Absorptionsspektren der BV-Bindung an BphP WT. Zu 20  $\mu\text{M}$  apo-BphP wurden steigende Konzentrationen an BV (0 – 100  $\mu\text{M}$ ) gegeben, die Ansätze 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert und Absorptionsspektren zwischen 300 und 800 nm aufgenommen. Das Insert zeigt einen hyperbolischen Plot zur Berechnung des  $K_{\text{a}}$ -Werts in  $\mu\text{M}$ .

#### 4.6.5 Chromophorbindestelle

Alle Daten zur Charakterisierung der Chromophorbindestelle, sowohl für das Phytochrom aus *P. aeruginosa* (BphP) wie auch für das Phytochrom aus *A. nidulans* (FphA), weisen darauf hin, dass der Chromophor BV IX $\alpha$  kovalent an einem konservierten Cysteinrest in der P2-Domäne in der Nähe des N-Terminus gebunden wird. In *PaBphP* handelt es sich dabei um die Position 12, in FphA um die Position 195. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten, die man für das Phytochrom aus *A. tumefaciens* (Agp1) (Lamparter *et al.*, 2002; Lamparter *et al.*, 2003; Lamparter *et al.*, 2004) und aus *D. radiodurans* (Wagner *et al.*, 2005) erhalten hat, überein. Die Theorie, dass das Fehlen eines konservierten Cysteinrests in der GAF-Domäne zur Nutzung von BV als Chromophor und zur Bindung des Chromophors an einem konservierten Cysteinrest in der P2-Domäne führt, wird hiermit bestätigt (Lamparter, 2004). Dennoch scheint die GAF-Domäne eine wichtige Rolle zu spielen, was an der spektralen

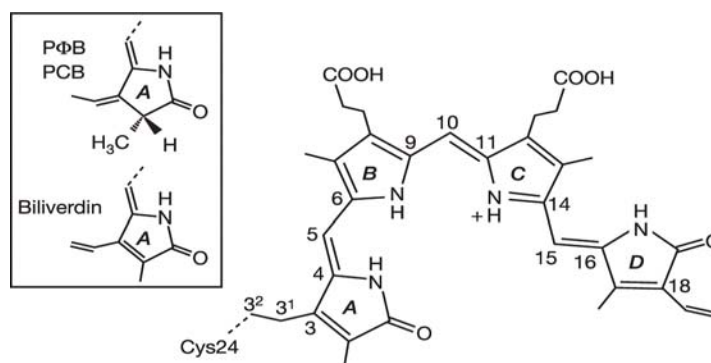
Verschiebung des Differenzspektrums der Variante BphP H247Q deutlich wird. Die GAF-Domäne könnte bei der Stabilisierung und Koordination des Chromophors, aber auch bei der Knüpfung der kovalenten Bindung am N-terminalen Cystein beteiligt sein. Für das Phytochrom aus *D. radiodurans* wurde z.B. gezeigt, dass BV kovalent an dem Cystein in der N-terminalen PAS-Domäne bindet und in einer Furche innerhalb der GAF-Domäne liegt (Wagner *et al.*, 2005).

Die Variante FphA C195A aus *A. nidulans* war nicht mehr in der Lage BV zu binden, d.h. es konnte kein Differenzspektrum gemessen werden (Daten nicht gezeigt). *PaBphP* C12-Varianten assemblierten zwar BV, die Affinität zu BV war jedoch 6-fach geringer als die Affinität des Wildtyps. Die Absorptionsspektren der holo-BphP C12-Varianten ähnelten sowohl nach Bestrahlung mit hellrotem als auch nach Bestrahlung mit dunkelrotem Licht der Pr-Form des Wildtyps (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu ist die Variante Agp1 C20A aus *A. tumefaciens* photoreversibel. Sie zeigt im Vergleich zu Agp1 WT einen reduzierten Absorptionskoeffizienten, ein blau-verschobenes Pfr-Maximum und ein reduziertes Verhältnis zwischen Pr- und Pfr-Form (Lamparter *et al.*, 2002). Die Mutation des konservierten Cysteinrests in *PaBphP* und *FphA* hat somit sehr viel stärkere Auswirkungen als in *Agp1*. In *PaBphP* scheint diese Mutation sowohl eine kovalente Bindung des Chromophors als auch eine Stabilisierung der Pfr-Form zu verhindern. Dies könnte durch das Fehlen bzw. durch falsch orientiertes BV in der Chromophor-Bindetasche erklärt werden. Diese Mutation führt folglich zu einer Veränderung der strukturellen Umgebung, die für eine kovalente Bindung notwendig ist.

## **4.7 Dreidimensionale Struktur der Chromophor-bindenden Domäne des *D. radiodurans* Phytochroms**

Ziel dieser Arbeit war, eine Kristallstruktur des Phytochroms aus *P. aeruginosa* zu erhalten. Trotz zahlreicher Ansätze, war es jedoch nicht möglich *PaBphP* zu kristallisieren, was auf die hohe Dynamik innerhalb des holo-BphP zurückgeführt werden kann. Zum Ende dieser Arbeit wurde die Struktur der Chromophor-bindenden Domäne des *D. radiodurans* Phytochroms (*DrCBD*) publiziert und anhand dieser Struktur können die Daten des *PaBphP* erklärt werden. Durch die dreidimensionale Struktur der *DrCBD* wird deutlich, dass der Chromophor kovalent an einem N-terminalen Cysteinrest gebunden wird und in einer Furche innerhalb der

GAF-Domäne liegt (Wagner *et al.*, 2005). Die Struktur wurde für den Pr-Grundzustand gelöst und BV liegt hier in einer  $5Z_{\text{syn}}$ ,  $10Z_{\text{syn}}$ ,  $15Z_{\text{anti}}$ -Konformation vor (Abb. 26).



**Abbildung 26:** Bindung von BV an *DrCBD* im Pr-Grundzustand. BV ist mit dem C3<sup>2</sup>-Atom im A-Ring mit dem Cystein 24 verknüpft und liegt in einer  $5Z_{\text{syn}}$ ,  $10Z_{\text{syn}}$ ,  $15Z_{\text{anti}}$ -Konformation vor. Insert: Struktur des A-Rings von PΦB, PCB und BV vor einer kovalenten Bindung.

Die *DrCBD* besteht sowohl aus der N-terminalen PAS- als auch aus der GAF-Domäne (Abb. 27). Die PAS-Domäne zeigt ein typisches fünfsträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, welches von drei  $\alpha$ -Helices flankiert wird. Die konkave Oberfläche bildet möglicherweise eine Seite für Protein-Protein-Interaktionen. Die GAF-Domäne enthält ein sechssträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, welches zwischen einem Helixbündel liegt. PAS- und GAF-Domäne sind über zehn Aminosäuren miteinander verbunden. Die N-terminale Region (35 Aminosäuren) liegt als „*random coil*“ vor und interessanterweise wird BV an dem konservierten Cysteinrest (Cystein 24) in dieser Region gebunden. In der dreidimensionalen Struktur liegt diese Region innerhalb der GAF-Domäne. Somit wird der Chromophor zwar in der PAS-Domäne gebunden, die GAF-Domäne bildet jedoch den größten Teil der Chromophorbindetasche aus. Da die Aminosäuren der PAS- und GAF-Domäne innerhalb der Phytochrom-Familie hoch konserviert sind (Karniol *et al.*, 2005), kann man davon ausgehen, dass sich die Chromophorbindetaschen aller Phytochrome stark ähneln. Durch die Anordnung des N-Terminus innerhalb der GAF-Domäne liegt BV in der Region, in der in pflanzlichen oder cyanobakteriellen Phytochromen der Chromophor gebunden wird.

Durch die Struktur der *DrCBD* kann auch die spektrale Verschiebung des Differenzspektrums in der Variante *PaBphP* H247Q erklärt werden. In *DrBphP* kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen BV und einem Histidinrest, welcher dem Rest H247 des *PaBphP*

entspricht. Aufgrund der hohen Homologien im Bereich der CBD, kann somit davon ausgegangen werden, dass in *PaBphP* der Chromophor ähnlich wie in *DrBphP* in der N-terminalen PAS-Domäne gebunden wird und die GAF-Domäne auch hier die Chromophorbindetasche ausbildet.

(A)



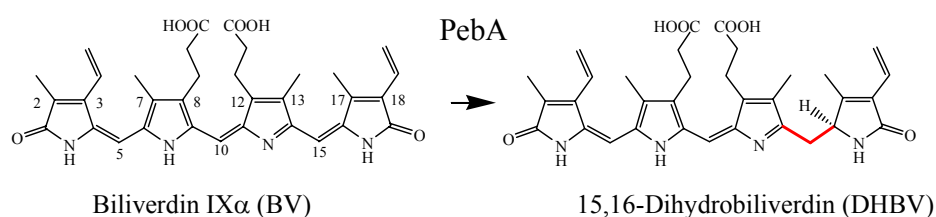
(B)



**Abbildung 27:** Dreidimensionale Struktur der Chromophor-bindenden Domäne des *D. radiodurans* Phytochroms (DrCBD). N-terminale Region, PAS-Domäne (blau), GAF-Domäne (grün). (A) BV (blau) wird kovalent an Cystein 24 (orange) gebunden; (B) BV (blau) sitzt in einer Spalte innerhalb der GAF-Domäne.

## 4.8 Photoisomerisierung von *Pa*BphP

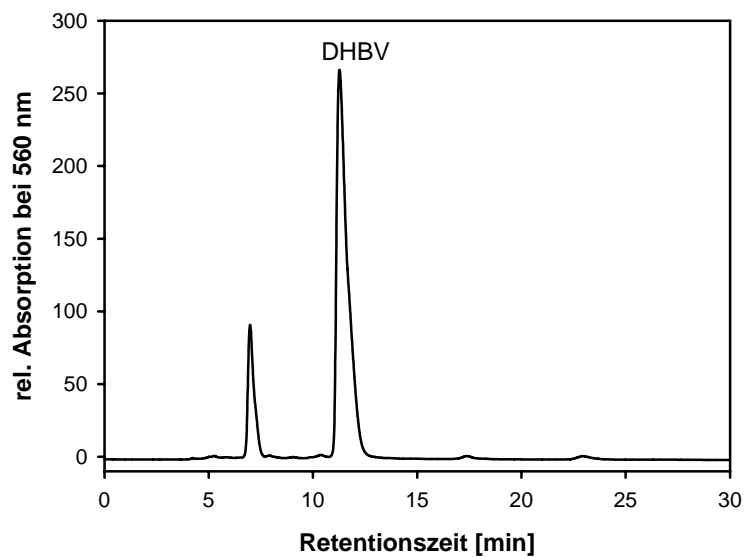
Die Funktion von pflanzlichen Phytochromen verläuft über eine lichtinduzierte 15Z/15E-Isomerisierung des Chromophors Phytochromobilin (Li & Lagarias, 1992). Fehlt diese Doppelbindung wie z.B. in Phycoerythrobilin (PEB), kommt es nicht mehr zu einer Photoisomerisierung, sondern zu einer Fluoreszenz des Phytochrom-Addukts. Fluoreszente Phytochrom-Addukte werden auch als Phytofluor bezeichnet (Murphy & Lagarias, 1997). Um herauszufinden, ob die Photoisomerisierung in *Pa*BphP auch auf eine 15Z/15E-Isomerisierung des Chromophors BV zurückzuführen ist, wurde apo-BphP mit 15,16-Dihydrobiliverdin (DHBV) - einem BV-Analogen, welches an der C15-Doppelbindung reduziert ist - inkubiert und charakterisiert. 15,16-DHBV kann aus BV in *vitro* durch die Bilinreduktase 15,16-DHBV:Ferredoxin Oxidoreduktase (PebA) durch eine zwei-Elektronen-Reduktion an der C15-Methinbrücke des BV synthetisiert werden (Abb. 28).



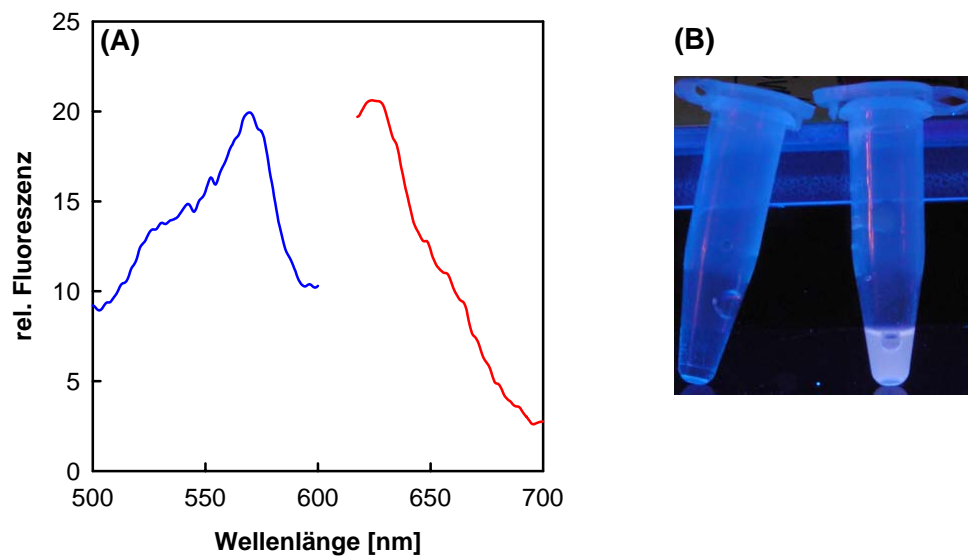
**Abbildung 28:** Umsetzung von Biliverdin (BV IX $\alpha$ ) zu 15,16-Dihydrobiliverdin (DHBV) durch die Bilinreduktase PebA.

In einem Bilinreduktase-Enzymtest wurde BV durch die Bilinreduktase PebA aus *F. diplosiphon* (freundlicherweise von T. Dammeyer zur Verfügung gestellt) zu DHBV umgesetzt, mittels HPLC aufgetrennt und analysiert (Abb. 29).

BV ist komplett zu DHBV umgesetzt worden und die Retentionszeit von DHBV lag bei ca. 12 min. Das so gewonnene DHBV konnte daher ohne weiteren Reinigungsschritt als Chromophor für BphP getestet werden. Aufgrund der Endo-Vinyl-Gruppe im A-Ring des Chromophors DHBV ist *Pa*BphP in der Lage diesen Chromophor zu binden. In Abbildung 30A ist das Fluoreszenzspektrum von BphP:DHBV dargestellt. Anregung bei 570 nm führte zu einem Phytofluor mit einem Emissionsmaximum bei 630 nm. Das entstandene Addukt war unter UV-Licht (312 nm) orange-fluoreszierend (Abb. 30B).



**Abbildung 29:** HPLC Analyse des Bilinreduktase Enzymtest. 1  $\mu$ l des gereinigten DHBV wurden mit 200  $\mu$ l mobiler Phase [Aceton:20 mM Ameisensäure (50:50)] versetzt und mittels HPLC auf Reinheit überprüft. Die Analyse erfolgte durch Messung der Absorption bei 560 nm (DHBV) und 650 nm (BV).



**Abbildung 30:** (A) Phytofluor-Fluoreszenz-Spektren von BphP inkubiert mit DHBV. Das Anregungsspektrum (blau) wurde mit einer Emissionswellenlänge von 630 nm aufgenommen, das Emissionsspektrum (rot) mit einer Anregungswellenlänge von 570 nm. (B) Phytofluor unter UV-Licht bei 312 nm. Negativkontrolle (links), Phytofluor (rechts).

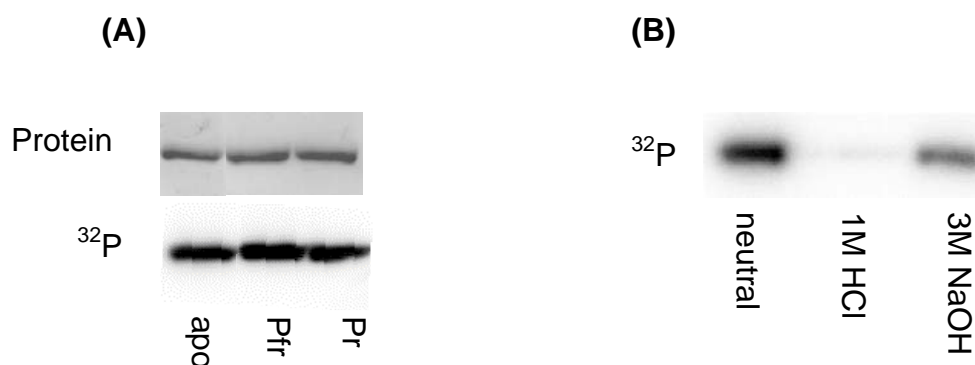
Die Bildung eines fluoreszenten Addukts von *PaBphP* mit DHBV zeigt, dass die photochemische Reaktion auf der 15Z/15E-Isomerisierung des Chromophors beruht. Dies wurde für pflanzliche Phytochrome schon gezeigt (Li & Lagarias, 1992). Obwohl der

Chromophor in bakteriellen im Vergleich zu pflanzlichen Phytochromen an einer anderen Position im Protein gebunden wird, weisen diese Daten auch darauf hin, dass die Chromophor-Bindungstasche bakterieller Phytochrome ähnlich der Bindungstasche pflanzlicher Phytochrome sein muß.

## 4.9 Autophosphorylierung

Sowohl BphP aus *P. aeruginosa* als auch FphA aus *A. nidulans* besitzen am C-Terminus eine Histidinkinasedomäne, welche Histidinkinasen aus bakteriellen Zwei-Komponentensystemen ähnelt (Abb. 2). Da für einige bakterielle Phytochrome die lichtregulierte Phosphorylierung eines Histidinrests beschrieben wurde, sollte überprüft werden, ob es sich bei *PaBphP* und FphA auch um lichtregulierte Histidinkinasen handelt.

### Autophosphorylierung von *PaBphP*:



**Abbildung 31:** Autoradiogram von BphP nach [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP-Markierung, SDS-PAGE und Elektrophoretogramm. (A) Autoradiogram der apo- und holo-Formen. (B) Stabilität der Phosphorylierung nach 1 h Inkubation in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 / 1 M HCl / 3 M NaOH bei RT.

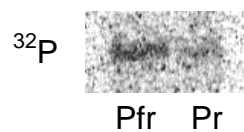
Autophosphorylierungsexperimente wurden nach Zugabe von [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP sowohl mit apo- als auch mit holo-BphP (in der Pr- und Pfr-Form) durchgeführt. Alle Formen zeigten Autophosphorylierung, wobei die Pfr-angereicherte Form eine leicht höhere Aktivität hatte als die Pr-Form (Abb. 31A). Dennoch konnte keine starke Lichtabhängigkeit beobachtet werden. Die Phosphorylierung war in alkalischer Lösung stabil und in saurer Lösung instabil (Abb. 31B), was darauf hinweist, dass es sich um eine Histidinkinase handelt. Dies wurde durch



Messen der Kinaseaktivität einer BphP-Variante, in der das mögliche Histidin (H513) gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, bestätigt. Mit dieser Variante konnte keine Kinaseaktivität mehr beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

#### Autophosphorylierung von FphA:

Autophosphorylierungsexperimente wurden nur mit holo-FphA in der Pr- und Pfr-Form durchgeführt. Beide Formen zeigten Autophosphorylierung, wobei diese sehr schwach war und so keine Aussage über die Lichtabhängigkeit der Phosphorylierung gemacht werden konnte (Abb. 32).



**Abbildung 32:** Autoradiogram von FphA in der Pfr- und Pr-Form nach [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP-Markierung, SDS-PAGE und Elektrophoretogramm.

Sowohl *PaBphP* als auch FphA sind Histidinkinasen. Eine Kinaseaktivität wurde für pflanzliche Phytochrome schon vor über 15 Jahren beschrieben (Wong *et al.*, 1989), wobei es sich bei diesen um Serin/Threonin-Kinasen handelt (Yeh & Lagarias, 1998). Histidinkinaseaktivität wurde jedoch auch in Cph1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Yeh *et al.*, 1997) oder Agp1 und Agp2 aus *A. tumefaciens* (Karniol & Vierstra, 2003) nachgewiesen. Im Gegensatz zu *PaBphP* ist die Autophosphorylierung in Cph1 stark lichtabhängig. Die Kinaseaktivität in der Pr-Form ist höher als in der Pfr-Form. Eine höhere Aktivität in der Pr-Form wurde auch für Agp1 beschrieben, wobei die Aktivität in der Pr-Form doppelt so hoch ist wie in der Pfr-Form (Karniol & Vierstra, 2003). Im Vergleich dazu hat Agp2 eine entgegengesetzte Regulation der Kinaseaktivität, was auch in *PaBphP* beobachtet wurde. Die Autophosphorylierung in Agp2 ist in der Pfr-Form 5-mal höher als in der Pr-Form. Die im Vergleich dazu schwache Lichtabhängigkeit in *PaBphP* kann auf den hohen Pr-Anteil in der Pfr-, d.h. Pfr-angereicherten Form zurückgeführt werden. Interessanterweise ist in Agp2 und *PaBphP* nicht nur die Aktivität in der Pfr-Form höher, sondern beide liegen auch im Grundzustand in dieser Form vor (Kap. 4.4). Die Funktion des Pfr-Grundzustandes in Agp2 oder *PaBphP* ist nicht bekannt. *PaBphP* könnte in *P. aeruginosa* aber als Sensor für das Verhältnis zwischen dunkelrotem und rotem Licht dienen.

Auch in FphA konnte Kinaseaktivität nachgewiesen werden, d.h. auch hier verläuft eine Signalübertragung über Phosphorylierung. Höchstwahrscheinlich findet die Auto-phosphorylierung auch an einem konservierten Histidinrest in der HKD statt und die Phosphatgruppe wird anschließend auf einen Aspartatrest im C-terminal lokalisierten Antwortregulator übertragen. Diese dynamische Phosphorylierung könnte der Grund für die sehr schwache Aktivität *in vitro* sein.

## 4.10 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD)

Zur strukturellen Charakterisierung von holo-BphP in der Dunkel-, Pr- und Pfr-angereicherten Form wurde Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) angewandt. Es wurden sowohl Spektren zwischen 250 nm und 180 nm als auch Spektren zwischen 800 nm und 300 nm aufgenommen.

In Abbildung 33 ist das Spektrum von holo-BphP im Fern-UV-Bereich dargestellt. Die Spektren der Pr- und Pfr-angereicherten Form waren sich sehr ähnlich und zeigten beide negative Elliptizität bei ca. 220 nm und positive bei ca. 190 nm. Wie in Cph1 und pflanzlichen Phytochromen war kein signifikanter Unterschied zwischen der Pr- und Pfr-angereicherten Form in der Sekundärstruktur zu erkennen. Die Berechnung der Sekundärstrukturverteilung erfolgte mit dem Programm Dicroprot und ergab einen überwiegend  $\alpha$ -helikalen Gehalt, was schon für Cph1 und pflanzliche Phytochrome gezeigt wurde (Park *et al.*, 2000; Song *et al.*, 1996; Sommer & Song, 1990).

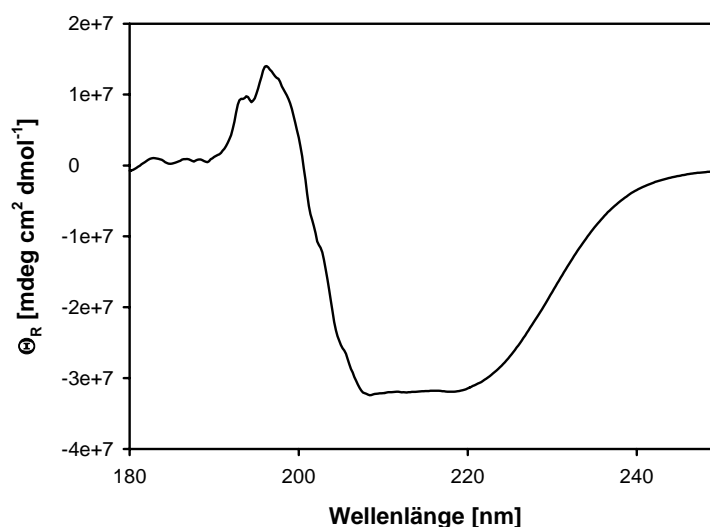
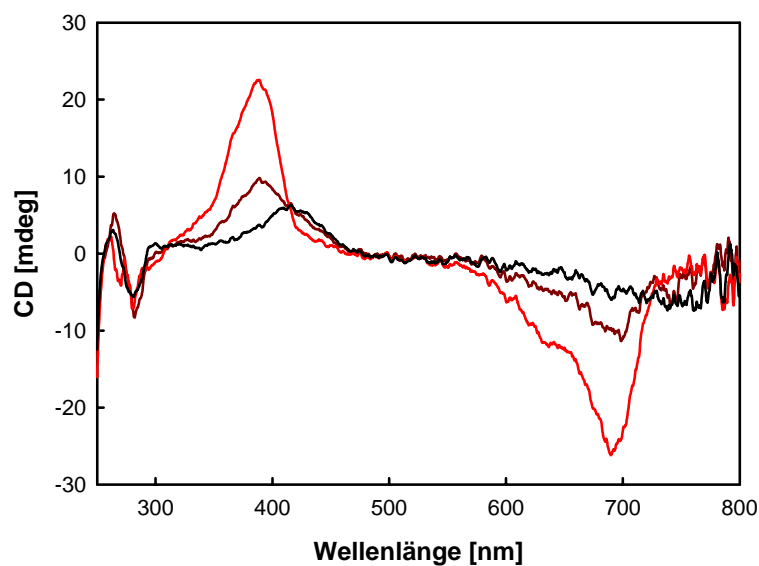


Abbildung 33: CD-Spektrum von holo-BphP im Fern-UV-Bereich.

Die CD-Spektren der Pr-, Pfr-angereicherten und Dunkelform zwischen 300 nm und 800 nm sind in Abbildung 34 dargestellt. Das CD-Spektrum der Pr-Form zeigte positive Elliptizität bei ca. 390 nm und negative bei ca. 700 nm. Im Gegensatz dazu war im Pfr-angereicherten Spektrum eine reduzierte Elliptizität zu erkennen, wobei die Maxima auch hier bei ca. 390 nm und ca. 700 nm lagen. Im Spektrum der Dunkelform verschwand der Peak bei 700 nm und es fand eine Rotverschiebung der positiven Elliptizität statt. Das CD-Spektrum der Pr-Form von BphP zeigte Ähnlichkeit zu den Pr-Spektren von Cph1 und dem pflanzlicher Phytochrome (Litts *et al.*, 1983). Das Pr-Spektrum pflanzlicher Phytochrome ist charakterisiert durch eine starke positive und negative Elliptizität, wobei die Wellenlängen jedoch mit 370 nm und 668 nm blau-verschoben sind. Auch das CD-Spektrum der Pr-Form von Cph1 weist im Vergleich zu BphP eine Wellenlängenverschiebung auf (340 nm und 640 nm). Dies ist auf das ausgeprägtere  $\pi$ -Elektronensystem von BV im Vergleich zu den pflanzlichen bzw. cyanobakteriellen Chromophoren P $\Phi$ B und PCB zurückzuführen. Ein größerer Unterschied war in den CD-Spektren der Pfr-angereicherten Form zu erkennen. Während es in BphP lediglich zu einer Reduzierung der Elliptizitäten kam, beobachtet man in Cph1 z.B. eine Umkehr der Elliptizitäten und eine zusätzliche positive Elliptizität bei ca. 420 nm. Auch in pflanzlichen Phytochromen kommt es zu einer Umkehr der Elliptizitäten, jedoch sind die Maxima weniger ausgeprägt. Der geringe Unterschied in den CD-Spektren der Pr- und Pfr-angereicherten Form in BphP ist auf den im Vergleich zu pflanzlichen Phytochromen sehr hohen Pr-Anteil in der Pfr-angereicherten Form zurückzuführen. Aufgrund der ähnlichen CD-Spektren besonders in der Pr-Form, kann man jedoch davon ausgehen, dass sich die Chromophorbindetaschen von Cph1, BphP und pflanzlichen Phytochromen nicht stark unterscheiden.

Sowohl die Pr- als auch die Pfr-angereicherte Form von BphP unterlagen einer Dunkelreversion (Daten nicht gezeigt). Es wurde einerseits Verschiebung der positiven Elliptizität deutlich, andererseits eine Reduzierung sowohl der positiven als auch der negativen Elliptizität. Diese Dunkelreversion beider Formen wurde schon mittels Absorptionsspektroskopie nachgewiesen (Abb. 18B,C).



**Abbildung 34:** CD-Spektren von holo-BphP in der Dunkelform (schwarz), Pr-Form (hellrot) und Pfr-angereicherten Form (dunkelrot) zwischen 300 nm und 800 nm.

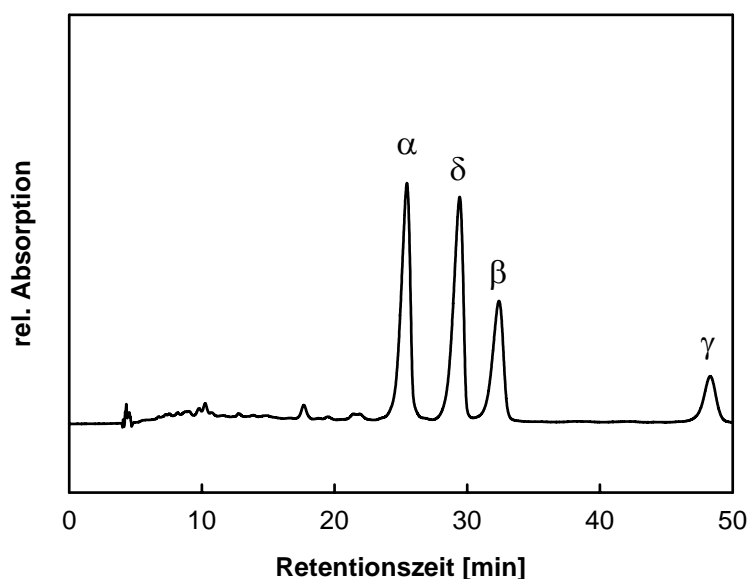
## 4.11 Interaktion zwischen *Pa*BphP und Hämoxygenase: Biliverdin-Komplexen

*P. aeruginosa* ist der erste beschriebene Organismus, in dem zwei Hämoxygenasen (HO) mit unterschiedlicher Regiospezifität für die Spaltung von Häm gefunden wurden. PigA katalysiert die Reaktion von Häm zu den ungewöhnlichen Biliverdinisomeren IX $\beta$  und IX $\delta$ , BphO die Umsetzung von Häm zu BV IX $\alpha$ . Sowohl die rekombinante Produktion von BphO als auch die Produktion von PigA führen zu einem stabilen Komplex mit BV. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt aller Hämoxygenasereaktionen ist die Freisetzung von BV aus einem HO:BV Komplex. In HOs aus Säugern ist das Enzym Biliverdinreduktase (BVR), ein Enzym des Hämabbaus, welches die Reaktion von BV zu Bilirubin katalysiert, an der Freisetzung von BV involviert (Liu & Ortiz de Montellano, 2000). *P. aeruginosa* besitzt kein BVR-Homolog und so muß ein anderes Enzym an der Freisetzung von BV beteiligt sein. Es war von Interesse, ob apo-BphP in der Lage ist, BV aus einem HO:BV-Komplex zu binden und eine HO somit den Chromophor für BphP liefert. Zur Charakterisierung der

Interaktion zwischen BphP und den beiden Hämoxxygenasen wurden sowohl Experimente mittels GPC durchgeführt als auch spektroskopische Methoden angewendet.

#### 4.11.1 Synthese der vier Biliverdinisomere BV IX $\alpha$ , IX $\beta$ , IX $\delta$ und IX $\gamma$

Da bei der Reaktion von PigA immer ein Gemisch aus BV IX $\beta$  und IX $\delta$  entsteht, ist es von Interesse, welches BV-Isomer an BphP binden kann und so war es notwendig die BV-Isomere zu isolieren. Die vier Biliverdinisomere IX $\alpha$ , IX $\beta$ , IX $\delta$  und IX $\gamma$  wurden durch eine gekoppelte Oxidation von Häm (Bonnett & McDonagh, 1973) synthetisiert und mittels präparativer HPLC isoliert. Abbildung 35 zeigt die HPLC Analyse des Biliverdingemisches. Häm ist zu den vier Biliverdinisomeren umgesetzt worden, wobei die Retentionszeit von BV IX $\alpha$  bei ca. 25 min, von BV IX $\delta$  bei ca. 29 min, von BV IX $\beta$  bei ca. 32 min und von BV IX $\gamma$  bei ca. 48 min lag. Die einzelnen Peaks wurden fraktioniert aufgefangen, über eine SepPak-Säule gereinigt, eingetrocknet und für weitere Analysen verwendet.

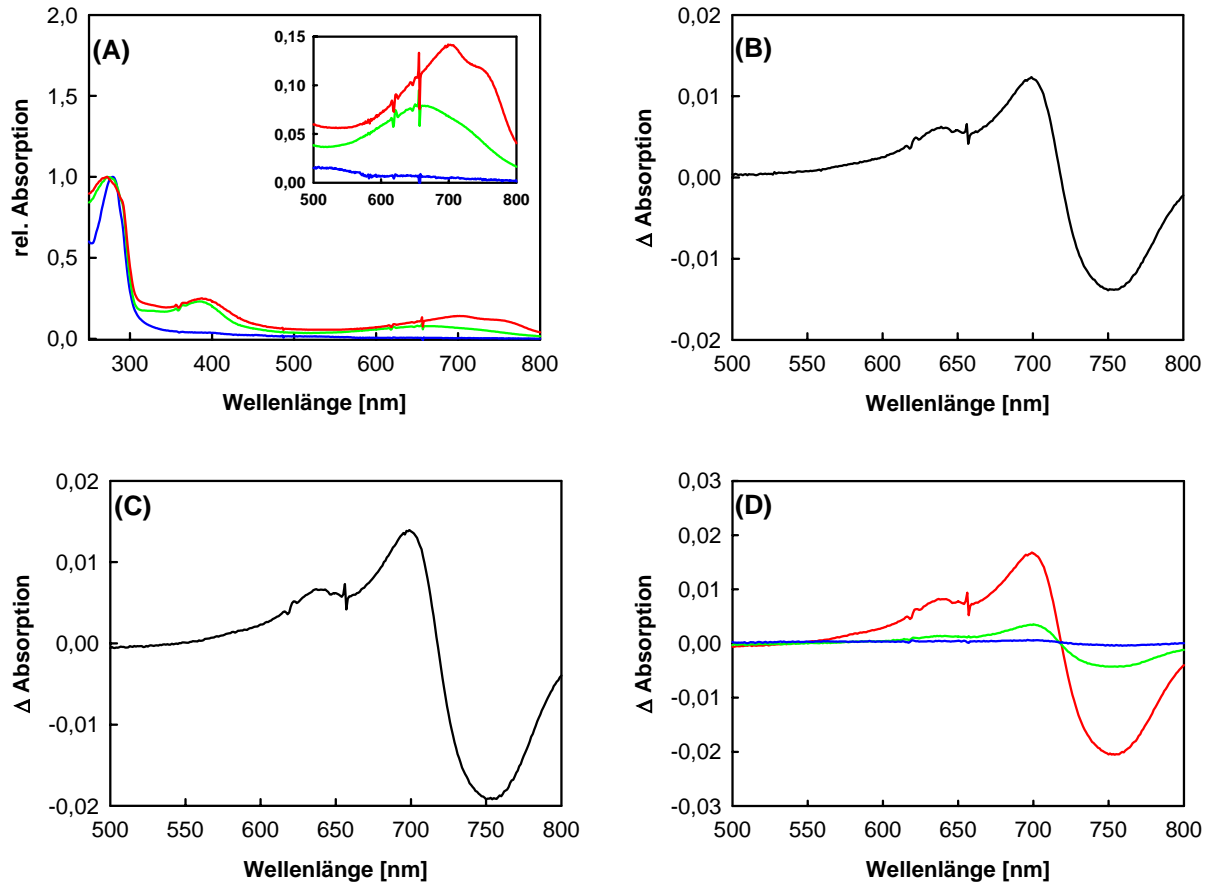


**Abbildung 35:** HPLC-Analyse der vier Biliverdinisomere BV IX $\alpha$ , IX $\beta$ , IX $\delta$  und IX $\gamma$  nach einer gekoppelten Oxidation von Häm.

#### 4.11.2 Interaktion zwischen BphP und BphO:BV bzw. PigA:BV

Um zu untersuchen, ob PaBphP in der Lage ist BV aus einem HO:BV-Komplex zu binden, wurde apo-BphP mit rekombinant gereinigtem BphO:BV bzw. PigA:BV (freundlicherweise

von R. Wegele zur Verfügung gestellt) inkubiert und die spektralen Änderungen betrachtet. Zur Überprüfung der holo-BphP Bildung wurden anschließend Differenzspektren aufgenommen.



**Abbildung 36:** Charakterisierung der Interaktion zwischen HO:BV-Komplexen und BphP. (A) Absorptionsspektren von apo-BphP (blau), BphO:BV-Komplex (grün) und einer Mischung (1:1) von beiden. Das Insert zeigt eine Vergrößerung des Spektrums zwischen 500 und 800 nm. (B) Differenzspektrum einer 1:1 Mischung aus apo-BphP und BphO:BV. (C) Differenzspektrum einer 1:1 Mischung aus apo-BphP und PigA:BV. (D) Differenzspektren von apo-BphP mit den BV-Isomeren BV IX $\alpha$  (rot), IX $\beta$  (blau) und IX $\delta$  (grün).

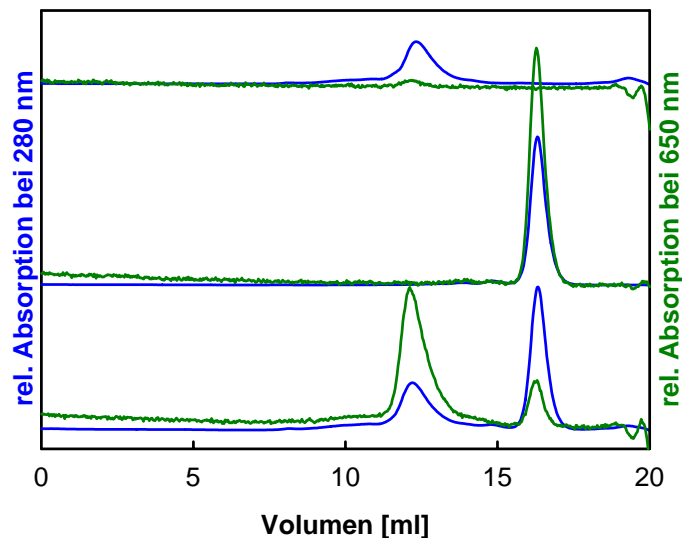
Abbildung 36A zeigt Absorptionsspektren von apo-BphP, des BphO:BV-Komplexes und ein Absorptionsspektrum, welches nach Inkubation von apo-BphP mit BphO:BV aufgenommen wurde. Das BphO:BV Spektrum ändert sich nach der Inkubation mit apo-BphP, was auf die Bildung von holo-Phytochrom zurückzuführen ist. Auch nach der Inkubation von PigA:BV mit apo-BphP kann man die Bildung von holo-BphP beobachten. Es konnten außerdem charakteristische Differenzspektren aufgenommen werden (Abb. 36B,C), d.h. apo-BphP war in der Lage BV sowohl aus einem BphO:BV-Komplex als auch aus einem PigA:BV-Komplex zu binden und aktives holo-Phytochrom zu bilden. Da bei der Reaktion von PigA eine

Mischung aus BV IX $\beta$  und BV IX $\delta$  in einem Verhältnis von 30:70 entsteht, stellte sich die Frage, mit welchem Isomer BphP aktives holo-Phytochrom bildet. Hierfür wurden Differenzspektren mit den isolierten BV-Isomeren aufgenommen (Abb. 36D). Nur die Biliverdinisomere BV IX $\alpha$  und IX $\delta$  waren in der Lage holo-Phytochrom zu bilden. Das Differenzspektrum, welches nach Inkubation von apo-BphP mit PigA:BV gemessen wurde (Abb. 36C), ist somit auf die Bindung von BV IX $\delta$  zurückzuführen. Der  $\Delta\Delta A$ -Wert im Spektrum mit BV IX $\delta$  war nur 1/5 des  $\Delta\Delta A$ -Werts im Spektrum mit BV IX $\alpha$ , was auf eine geringere Affinität von BphP zu BV IX $\delta$  gegenüber BV IX $\alpha$  hindeutet.

Auch mittels GPC konnte gezeigt werden, dass apo-BphP in der Lage war BV aus einem HO:BV-Komplex zu binden. In Abbildung 37 ist das Experiment mit BphO:BV dargestellt. Sowohl BphP als auch BphO eluierten als getrennte Proteine von der Säule. Die Absorption wurde sowohl bei 280 nm (Protein) als auch bei 650 nm (BV) gemessen und man erkennt, dass BphO einen stabilen Komplex mit BV bildete. Nach der Inkubation von apo-BphP mit BphO:BV konnten die beiden Proteine immer noch getrennt werden, es war aber ein hoher Anteil der Absorption bei 650 nm im BphP-Peak zu erkennen. Durch Zink-induzierte rote Fluoreszenz wurde eine kovalente Bindung zwischen BphP und BV nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

BphP interagiert somit mit dem BphO:BV-Komplex und erleichtert die Freisetzung von BV unter Bildung eines stabilen, kovalenten Addukts. BphP war aber nicht nur in der Lage eisen-freies BV zu binden, wie es in diesen Experimenten gezeigt wurde, sondern auch Fe<sup>3+</sup>-BV, ein Produkt, welches bei einer Reaktion von BphO mit Ferredoxin als Reduktionsmittel entsteht (Daten nicht gezeigt). Diese Daten weisen darauf hin, dass BphO den Chromophor für BphP liefert und dass die Aktivität von BphO durch die Interaktion zwischen BphP und BphO reguliert wird. Dafür spricht auch, dass die Gene *bphP* und *bphO* in *P. aeruginosa* in einem Operon vorliegen. BphP interagiert aber auch mit dem PigA:BV-Komplex, d.h. BphP war in der Lage das BV-Isomer IX $\delta$ , welches im A-Ring eine endo-Vinyl-Gruppe besitzt, aus dem PigA:BV-Komplex freizusetzen. Die Freisetzung von BV aus einem HO:BV-Komplex wird somit von der Art des gebundenen BV und nicht von der Natur des Proteins bestimmt. PigA könnte den Chromophor für BphP liefern, aber die Menge an holo-Phytochrom mit BV IX $\delta$  war nur 1/5 im Vergleich zu holo-Phytochrom mit BV IX $\alpha$ , was auf eine niedrigere Affinität von BphP zu BV IX $\delta$  zurückzuführen ist. Obwohl gezeigt wurde, dass BphP in der Lage ist auch BV IX $\delta$  zu binden, ist die physiologische Bedeutung nicht klar, da die Expression von PigA nur unter eisen-limitierenden Bedingungen verläuft und es momentan

nicht bekannt ist, ob BphP auch unter diesen Bedingungen exprimiert wird. Außerdem geht man davon aus, dass BV IX $\beta$  das natürliche Reaktionsprodukt der PigA Reaktion ist und BV IX $\delta$  überwiegend bei der rekombinanten Produktion von PigA entsteht. Dadurch kann eine Konkurrenzreaktion der beiden Hämoxxygenasen in *P. aeruginosa* ausgeschlossen werden.



**Abbildung 37:** Gelpermeationschromatographie an Superdex 200 HR 10/30 von BphP und BphO. Apo-BphP (oben), BphO:BV (Mitte), 1:1 Gemisch von BphP mit BphO:BV (unten). Die Absorption wurde bei 280 nm (Protein; blau) und 650 nm (BV; grün) gemessen.

## 4.12 Funktion

Die Funktion von Phytochromen in nicht-photosynthetischen Mikroorganismen wie z.B. *P. aeruginosa* oder *A. tumefaciens* ist nicht bekannt. Zur Aufklärung der Funktion des Phytochroms in *P. aeruginosa* wurden sowohl Promotoruntersuchungen durch Promotor-lacZ-Fusion durchgeführt als auch Phytochrom-defiziente Mutanten in *P. aeruginosa* konstruiert und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen z.B. mittels 2D-Gelelektrophorese charakterisiert (Benkartek, 2005). Zu diesem Zeitpunkt lässt sich jedoch noch keine Aussage über die Bedeutung des Phytochroms in *P. aeruginosa* treffen.



Auch zur Aufklärung der Funktion des Phytochroms in *A. nidulans* wurden Phytochromdefiziente Mutanten ( $\Delta$ FphA) konstruiert (Blumenstein, 2004). Es war bekannt, dass die sexuelle Entwicklung in *A. nidulans* bei Einwirkung von rotem Licht gehemmt ist und dies durch Einwirkung von dunkelrotem Licht wieder aufgehoben werden kann (Mooney & Yager, 1990). Durch Charakterisierung der  $\Delta$ FphA-Mutante konnte dies phänotypisch sichtbar gemacht werden (Blumenstein, 2004). Sowohl die Inkubation des Wildtyps als auch der  $\Delta$ FphA-Mutante im Dunkeln führte zu einer sexuellen Entwicklung. Dies wurde an der gelben Farbe der Kolonien, welche durch die Kleistothezien entsteht, deutlich. In rotem Licht entwickelte sich die  $\Delta$ FphA-Mutante weiterhin sexuell, während der WT asexuell sporulierte, deutlich an der grünen Farbe der Konidien. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Phytochrom in *A. nidulans* als aktiver Photosensor agiert und die sexuelle Entwicklung unter rotem Licht unterdrückt.

## 5 Zusammenfassung

Phytochrome sind Photorezeptoren, die auf hellrotes bzw. dunkelrotes Licht reagieren. Sie tragen ein lineares Tetrapyrrol (Bilin) als prosthetische Gruppe, welches in einer autokatalytischen Reaktion am Protein gebunden wird. Phytochrome kommen in Pflanzen und Cyanobakterien vor, aber auch in einigen nicht-photosynthetischen Bakterien wie *Agrobacterium tumefaciens* oder *Pseudomonas aeruginosa* sowie einigen Pilzen wie *Neurospora crassa* oder *Aspergillus nidulans*. In der vorliegenden Arbeit gelang es, die Phytochrome aus *P. aeruginosa* (PaBphP) und aus *A. nidulans* (FphA) rekombinant in *E. coli* darzustellen und ihre Funktion als Phytochrom *in vitro* zu charakterisieren.

PaBphP reagiert mit Biliverdin IX $\alpha$  (BV) als Chromophor auf hell- und dunkelrotes Licht, was anhand charakteristischer Differenzspektren deutlich wurde. Im Grundzustand liegt PaBphP in der Pfr-Form vor und kann durch Einstrahlung von Licht mit der Wellenlänge 750 nm in die Pr-Form umgewandelt werden. Diese Reaktion ist reversibel und kann durch Licht der Wellenlänge 630 nm induziert werden. Kovalente Bindung des BV am Protein konnte durch Zink-induzierte rote Fluoreszenz nachgewiesen werden. Eine starke Bindung des Chromophors wurde zusätzlich durch ein Biliverdinreduktasetest, in dem freies BV in Bilirubin umgewandelt wird, bestätigt. Die Synthese eines BV-Analogons, in dem die C15/C16-Doppelbindung reduziert ist, zeigte, dass die Photoisomerisierung wie in Pflanzen an dieser Doppelbindung stattfindet. Durch die Assemblierung von PaBphP mit verschiedenen BV-Isomeren wurde deutlich, dass der Chromophor mit der Endo-Vinyl-Gruppe des A-Rings am Protein bindet. Nur mit diesen Isomeren war es möglich, charakteristische Differenzspektren aufzunehmen und eine kovalente Bindung wurde auch hier mittels Zink-induzierter Fluoreszenz nachgewiesen. Zur Charakterisierung der Chromophor-Bindestelle wurden gezielt Aminosäuren ausgetauscht und die erhaltenen Varianten untersucht. Im Gegensatz zu pflanzlichen Phytochromen, in denen ein konservierter Cysteinrest in der GAF-Domäne (BLD) den Chromophor bindet, ist hier ein Cystein (C12) in der N-terminalen PAS-Domäne (P2-Domäne) an der Chromophor-Bindung beteiligt. Dennoch scheint die GAF-Domäne eine wichtige Rolle bei der photochemischen Reaktion zu spielen, da der Austausch eines Histidinrests in dieser Domäne zu einer Verschiebung des Spektrums führte. Dies wird durch die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur der Chromophor-bindenden Domäne des Phytochroms aus *Deinococcus radiodurans* bestätigt.

Durch Autophosphorylierungsexperimente konnte die Funktion von *PaBphP* als Histidinkinase nachgewiesen werden. Die Kinaseaktivität ist in der Pfr-Form höher als in der Pr-Form. Da das Gen *bphP* zusammen mit dem hämoxygenase-codierenden Gen *bphO* in einem Operon vorliegt, scheint der natürliche Chromophor BV IX $\alpha$  zu sein. Apo-BphP war in der Lage BV IX $\alpha$  aus einem BphO:BV-Komplex zu binden und die Affinität für BV IX $\alpha$  war im Vergleich zu BV IX $\delta$ , ein BV-Isomer, welches von der zweiten Hämoxygenase PigA in *P. aeruginosa* produziert wird, sehr viel höher. Obwohl alle biochemischen Daten auf einen Photorezeptor hinweisen, bleibt die Funktion von *PaBphP* unbekannt.

Rekombinant gereinigtes holo-FphA aus *A. nidulans* zeigte ebenfalls alle Merkmale eines Phytochrom-Photorezeptors. Es assemblierte BV und das resultierende holo-FphA zeigte typische R/FR- Photoisomerisierung. Eine kovalente Bindung des BV an FphA wurde durch Zink-induzierte rote Fluoreszenz nachgewiesen. Der Austausch eines konservierten Cysteinrestes (C195) in der N-terminalen PAS-Domäne führte zu einem Verlust der BV-Bindung, was anhand der fehlenden Photoisomerisierung und negativen Zink-induzierten roten Fluoreszenz deutlich wurde. Somit wird in FphA der Chromophor auch an einem konservierten Cysteinrest in der N-terminalen PAS-Domäne gebunden. Die Funktion von FphA als Histidinkinase wurde durch Autophosphorylierungsexperimente gezeigt. Es konnte schwache Kinaseaktivität nachgewiesen werden. In *A. nidulans* hat FphA die Funktion eines Rotlichtsensors und unterdrückt die sexuelle Entwicklung unter hellrotem Licht.

## 6 Summary

Phytochromes are red-/far-red-light photoreceptors in plants and cyanobacteria but have recently been discovered in non-photosynthetic bacteria like *Agrobacterium tumefaciens* or *Pseudomonas aeruginosa* and in fungi like *Neurospora crassa* or *Aspergillus nidulans*. They carry a linear tetrapyrrole (bilin) prosthetic group which is covalently bound to the protein. Bilin-attachment to apo-phytochrome is autocatalytic. In this work the phytochrome from *P. aeruginosa* (PaBphP) and from *A. nidulans* (FphA) were recombinantly produced in *E. coli* and their function as a phytochrome was characterized *in vitro*.

PaBphP is able to autocatalytically form a photoconvertible holo-phytochrome with biliverdin IX $\alpha$ , which was shown by red-/far-red-light difference-spectroscopy. The ground state of PaBphP is the Pfr-form which can be converted to the Pr-form through illumination with far red light (750 nm). Covalent binding of biliverdin IX $\alpha$  was confirmed by zinc-induced red fluorescence. The strong attachment of biliverdin to BphP was further demonstrated using a biliverdin reductase (BVR) assay. In this assay, only free biliverdin is converted to bilirubin by BVR. To elucidate whether the photoisomerization is due to a 15Z/15E isomerization of the bilin, a biliverdin analogue which lacks the C15/C16 double bond was synthesized *in vitro* and assembled with apo-BphP. The phytofluor adduct obtained confirmed the involvement of the C15/C16 double bond in photoisomerization. To determine which part of the bilin is involved in covalent attachment to the protein various biliverdin derivatives were assembled with apo-BphP and characterized by difference spectroscopy and zinc-induced red fluorescence. An A-ring endo vinyl group is absolutely required for covalent attachment of the bilin. BphP lacks the conserved cysteine residue in the GAF domain which is the site of covalent chromophore attachment in plant and cyanobacterial phytochromes. To investigate the chromophore binding site in PaBphP, site directed mutants were generated and analyzed. Interestingly, BphP binds biliverdin at a conserved cysteine residue in the N-terminal PAS-domain. Nevertheless the GAF-domain seems to be important as a mutation of a histidine residue resulted in a spectral shift of the Pr and Pfr forms. This was further confirmed by the recently published crystal structure of the chromophore binding domain of *Deinococcus radiodurans* phytochrome. Autophosphorylation experiments confirmed the function of BphP as a histidine kinase. Only a weak light dependence has been observed with the Pfr form displaying highest kinase activity. Since the *bphP* gene is located downstream from a *bphO*

gene, which encodes a heme oxygenase (HO), the natural chromophore of BphP seems to be biliverdin IX $\alpha$ . BphP is able to interact with a BphO:BV complex and facilitates the release of biliverdin. The affinity of BphP to biliverdin IX $\delta$ , a biliverdin isomer which is produced by the second heme oxygenase PgaA in *P. aeruginosa* is only one fifth to the affinity to BV IX $\alpha$ . Although all biochemical data are indicative of a real photoreceptor, its function in *P. aeruginosa* remains unclear.

Recombinant produced holo-FphA showed also all characteristics of a bona fide phytochrome. It assembled biliverdin *in vitro* and the resultant holo-FphA showed red-/far-red-light photoisomerization. The covalent attachment of biliverdin IX $\alpha$  was confirmed by zinc-induced red fluorescence. Site directed mutagenesis identified a conserved cysteine residue in the N-terminal PAS-domain as chromophore binding site, which was shown by difference spectroscopy and zinc-induced red fluorescence. FphA is a histidine kinase which was confirmed by autophosphorylation experiments. A weak activity has been observed in the Pr and Pfr form. FphA has the function of a red-light sensor in *A. nidulans* and represses sexual development under red light.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aravind, L., and Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 458-459.
- Beale, S.I., and Cornejo, J. (1991a) Biosynthesis of Phycobilins. Ferredoxin-Mediated Reduction of Biliverdin Catalyzed by Extracts of *Cyanidium caldarium*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22328-22332.
- Beale, S.I., and Cornejo, J. (1991b) Biosynthesis of Phycobilins. 3(Z)-Phycoerythrobilin and 3(Z)-Phycocyanobilin are Intermediates in the Formation of 3(E)-Phycocyanobilin from Biliverdin IX $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, **266**, 22333-22340.
- Beale, S.I., and Cornejo, J. (1991c) Biosynthesis of Phycobilins. 15,16-Dihydrobiliverdin IX $\alpha$  is a Partially Reduced Intermediate in the Formation of Phycobilins from Biliverdin IX $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, **266**, 22341-22345.
- Benkartek, C. (2005) Struktur und Funktion des bakteriellen Phytochroms aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Universität Braunschweig.
- Berkelman, T.R., and Lagarias, J.C. (1986) Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **156**, 194-201.
- Bhoo, S.H., Davis, S.J., Walker, J., Karniol, B., and Vierstra, R.D. (2001) Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature*, **414**, 776-779.
- Blumenstein, A. (2004) Identifizierung und Charakterisierung des Phytochroms PhsA als Rotlicht-Sensor in *Aspergillus nidulans*. Diplomarbeit. Universität Marburg.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. and Fischer, R. (2005) The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol.*, **15**, 1-6.
- Bonnett, R., and McDonagh, A.F. (1973) The meso-reactivity of porphyrins and related compounds. Part VI. Oxidative cleavage of the Haem system. The four isomeric biliverdins of the IX series. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1973**, 881-888.
- Borgstahl, G.E.O., Williams, D.R., and Getzoff, E.D. (1995) 1.4 Å Structure of Photoactive Yellow Protein, a Cytosolic Photoreceptor: Unusual Fold, Active Site and Chromophore. *Biochemistry*, **34**, 6278-6287.

- Butler, W.L., Norris, K.H., Seigelman, H.W., and Hendricks, S.B. (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **45**, 1703-1708.
- Caignan, G.A., Deshmukh, R., Wilks, A., Zeng, Y., Huang, H.W., Moenne-Loccoz, P., Bunce, R.A., Eastman, M.A., and Rivera, M. (2002) Oxidation of heme to beta- and delta-biliverdin by *Pseudomonas aeruginosa* heme oxygenase as a consequence of an unusual seating of the heme. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14879-14892.
- Catlett, N.L., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G. (2003) Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot. Cell*, **2**, 1151-1161.
- Clack, T., Mathews, S., and Sharrock, R.A. (1994) The Phytochrome Apoprotein Family in *Arabidopsis* Is Encoded by Five Genes - The Sequences and Expression of PhyD and PhyE. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 413-427.
- Cornejo, J., Willows, R.D., and Beale, S.I. (1998) Phytyobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.*, **15**, 99-107.
- Davis, S.J., Kurepa, J., and Vierstra, R.D. (1999a) The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**, 6541-6546.
- Davis, S.J., Vener, A.V., and Vierstra, R.D. (1999b) Bacteriophytochromes: Phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science*, **286**, 2517-2520.
- Devlin, P.F., Halliday, K.J., Harberd, N.P., and Whitelam, G.C. (1996) The rosette habit of *Arabidopsis thaliana* is dependent upon phytochrome action: Novel phytochromes control internode elongation and flowering time. *Plant J.*, **10**, 1127-1134.
- Devlin, P.F., Patel, S.R., and Whitelam, G.C. (1998) Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1479-1487.
- Devlin, P.F., Robson, P.R.H., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A., and Whitelam, G.C. (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol.*, **119**, 909-915.
- Eichenberg, K., Baurle, I., Paulo, N., Sharrock, R.A., Rudiger, W., and Schafer, E. (2000) *Arabidopsis* phytochromes C and E have different spectral characteristics from those of phytochromes A and B. *FEBS Lett.*, **470**, 107-112.

- Frankenberg, N., Mukougawa, K., Kohchi, T., and Lagarias, J.C. (2001) Functional Genomic Analysis of the HY2 Family of Ferredoxin-Dependent Bilin Reductases from Oxygenic Photosynthetic Organisms. *Plant Cell*, **13**, 965-978.
- Furuya, M., and Schafer, E. (1996) Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *Trends Plant Sci.*, **1**, 301-307.
- Gambetta, G.A., and Lagarias, J.C. (2001) Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 10566-10571.
- Garner, W.W., and Allard, H.A. (1920) Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on the growth and reproduction of plants. *J. Agricult. Res.*, **18**, 553-606.
- Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- Giraud, E., Fardoux, J., Fourrier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B., and Vermeglio, A. (2002) Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature*, **417**, 202-205.
- Hartmann, K., Krooss, C., and Mollwo, A. (1997) Phytochrome-mediated photocontrol of the germination of the Scentless Mayweed, *Matricaria inodora* L, and its sensitization by nitrate and temperature (vol 40, pg 240 1997). *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **41**, 255-255.
- Herdman, M., Coursin, T., Rippka, R., Houmard, J., and de Marsac, N.T. (2000) A new appraisal of the prokaryotic origin of eukaryotic phytochromes. *J. Mol. Evol.*, **51**, 205-213.
- Ho, Y.S.J., Burden, L.M., and Hurley, J.H. (2000) Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J.*, **19**, 5288-5299.
- Hubschmann, T., Borner, T., Hartmann, E., and Lamparter, T. (2001) Characterization of the Cph1 holo-phytochrome from *Synechocystis* sp PCC 6803. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2055-2063.
- Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gartner, W., Wilde, A., and Borner, T. (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature*, **386**, 663.
- Jiang, Z.Y., Swem, L.R., Rushing, B.G., Devanathan, S., Tollin, G., and Bauer, C.E. (1999) Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science*, **285**, 406-409.



- Jorissen, H.J., Quest, B., Remberg, A., Coursin, T., Braslavsky, S.E., Schaffner, K., de Marsac, N.T., and Gartner, W. (2002) Two independent, light-sensing two-component systems in a filamentous cyanobacterium. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2662-2671.
- Karniol, B., and Vierstra, R.D. (2003) The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 2807-2812.
- Karniol, B., Wagner, J.R., Walker, J.M., and Vierstra, R.D. (2005) Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem. J.*, **392**, 103-116.
- Kehoe, D.M., and Grossman, A.R. (1996) Similarity of a Chromatic Adaptation Sensor to Phytochrome and Ethylene Receptors. *Science*, **273**, 1409-1412.
- Kehoe, D.M., and Grossman, A.R. (1997) New classes of mutants in complementary chromatic adaptation provide evidence for a novel four-step phosphorelay system. *J. Bacteriol.*, **179**, 3914-3921.
- Kelly, J.M., and Lagarias, J.C. (1985) Photochemistry of 124 kilodalton Avena phytochrome under constant illumination in vitro. *Biochemistry*, **24**, 6003-6010.
- Kolukisaoglu, H.U., Marx, S., Wiegmann, C., Hanelt, S., and Schneiderpoetsch, H.A.W. (1995) Divergence Of the Phytochrome Gene Family Predates Angiosperm Evolution and Suggests That Selaginella and Equisetum Arose Prior to Psilotum. *J. Mol. Evol.*, **41**, 329-337.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lagarias, D.M., Wu, S.-H., and Lagarias, J.C. (1995) Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Mol. Biol.*, **29**, 1127-1142.
- Lagarias, J.C., and Rapoport, H. (1980) Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the Pr form of the phytochrome chromophore. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4821-4828.
- Lagarias, J.C., Kelly, J.M., Cyr, K.L., and Smith, W.O., Jr. (1987) Comparative photochemical analysis of highly purified 124 kilodalton oat and rye phytochromes in vitro. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 5-13.
- Lamparter, T., Mittmann, F., Gartner, W., Borner, T., Hartmann, E., and Hughes, J. (1997) Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 11792-11797.

- Lamparter, T., Esteban, B., and Hughes, J. (2001) Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4720-4730.
- Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F., and Esteban, B. (2002) Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 11628-11633.
- Lamparter, T., Michael, N., Caspani, O., Miyata, T., Shirai, K., and Inomata, K. (2003) Biliverdin binds covalently to *agrobacterium* phytochrome Agp1 via its ring A vinyl side chain. *J. Biol. Chem.*, **278**, 33786-33792.
- Lamparter, T. (2004) Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Lett.*, **573**, 1-5.
- Lamparter, T., Carrascal, M., Michael, N., Martinez, E., Rottwinkel, G., and Abian, J. (2004) The biliverdin chromophore binds covalently to a conserved cysteine residue in the N-terminus of *Agrobacterium* phytochrome Agp1. *Biochemistry*, **43**, 3659-3669.
- Li, L., and Lagarias, J.C. (1992) Phytochrome Assembly - Defining Chromophore Structural Requirements for Covalent Attachment and Photoreversibility. *J. Biol. Chem.*, **267**, 19204-19210.
- Litts, J.C., Kelly, J.M., and Lagarias, J.C. (1983) Structure-function studies on phytochrome. Preliminary characterization of highly purified phytochrome from *Avena sativa* enriched in the 124-kilodalton species. *J. Biol. Chem.*, **258**, 11025-11031.
- Liu, Y., and Ortiz de Montellano, P.R. (2000) Reaction Intermediates and Single Turnover Rate Constants for the Oxidation of Heme by Human Heme Oxygenase-1. *J. Biol. Chem.*, **275**, 5297-5307.
- Mancinelli, A.L. (1986) Comparison of spectral properties of phytochromes from different preparations. *Plant Physiol.*, **82**, 956-961.
- Mathews, S., Lavin, M., and Sharrock, R.A. (1995) Evolution of the Phytochrome Gene Family and Its Utility for Phylogenetic Analyses of Angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **82**, 296-321.
- Mathews, S., and Sharrock, R.A. (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ.*, **20**, 666-671.
- Montgomery, B.L., and Lagarias, J.C. (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends in Plant Sci.*, **7**, 357-366.
- Mooney, J.L., and Yager, L.N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.*, **4**, 1473-1482.

- Muramoto, T., Kohchi, T., Yokota, A., Hwang, I.H., and Goodman, H.M. (1999) The Arabidopsis photomorphogenic mutant *hy1* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *Plant Cell*, **11**, 335-347.
- Murphy, J.T., and Lagarias, J.C. (1997) The phytofluors: a new class of fluorescent protein probes. *Curr. Biol.*, **7**, 870-876.
- Mutsaers, M., Michel, K.P., Zhang, X., Montgomery, B.L., and Golden, S.S. (2003) Biochemical properties of CikA, an unusual phytochrome-like histidine protein kinase that resets the circadian clock in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Biol. Chem.*, **278**, 19102-19110.
- Ni, M., Tepperman, J.M., and Quail, P.H. (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*, **400**, 781-784.
- Park, C.M., Shim, J.Y., Yang, S.S., Kang, J.G., Kim, J.I., Luka, Z., and Song, P.S. (2000) Chromophore-apoprotein interactions in *Synechocystis* sp PCC6803 phytochrome Cph1. *Biochemistry*, **39**, 6349-6356.
- Pellequer, J.L., WagerSmith, K.A., Kay, S.A., and Getzoff, E.D. (1998) Photoactive yellow protein: A structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc.Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 5884-5890.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D., and Bufton, A.W. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, **5**, 141-238.
- Ponting, C.P., and Aravind, L. (1997) PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr. Biol.*, **7**, R674-R677.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y., and Wagner, D. (1995) Phytochromes: Photosensory Perception and Signal Transduction. *Science*, **268**, 675-680.
- Quest, B., and Gartner, W. (2004) Chromophore selectivity in bacterial phytochromes: dissecting the process of chromophore attachment. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1117-1126.
- Ratliff, M., Zhu, W.M., Deshmukh, R., Wilks, A., and Stojiljkovic, I. (2001) Homologues of neisserial heme oxygenase in gram-negative bacteria: Degradation of heme by the product of the *pigA* gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.*, **183**, 6394-6403.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M., and Chory, J. (1993) Mutations In The Gene For The Red Far-Red Light Receptor Phytochrome-B Alter Cell Elongation And Physiological Responses Throughout Arabidopsis Development. *Plant Cell*, **5**, 147-157.

- Righetti, P.G. (1990) Recent developments in electrophoretic methods. *J. Chromatogr.*, **516**, 3-22.
- Rüdiger, W., and Thümmel, F. (1994) The phytochrome chromophore. In *Photomorphogenesis in plants*. Kendrick, R.E. and Kronenberg, G.H.M (eds.), Kluwer Academic publishers, Boston, pp 51-69.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schacter, B.A., Nelson, E.B., Marver, H.S., and Masters, B.S. (1972) Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J. Biol. Chem.*, **247**, 3601-3607.
- Schmitt, M.P. (1997) Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: Identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J. Bacteriol.*, **179**, 838-845.
- Schmitz, O., Katayama, M., Williams, S.B., Kondo, T., and Golden, S.S. (2000) CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science*, **289**, 765-768.
- Schneider-Poetsch, H.A.W., Braun, B., Marx, S., and Schaumburg, A. (1991) Phytochromes and Bacterial Sensor Proteins Are Related By Structural and Functional Homologies - Hypothesis on Phytochrome-Mediated Signal-Transduction. *FEBS Lett.*, **281**, 245-249.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., and Furuya, M. (1996) Action Spectra for Phytochrome A- and B-Specific Photoinduction of Seed Germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 8129-8133.
- Skaar, E.P., Gaspar, A.H., and Schneewind, O. (2004a) IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 436-443.
- Skaar, E.P., Humayun, M., Bae, T., DeBord, K.L., and Schneewind, O. (2004b) Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science*, **305**, 1626-1628.
- Smith, H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. *Nature*, **407**, 585-591.

- Sommer, D., and Song, P.S. (1990) Chromophore Topography And Secondary Structure Of 124-Kilodalton Avena Phytochrome Probed By Zn-2+-Induced Chromophore Modification. *Biochemistry*, **29**, 1943-1948.
- Song, P.S., Sommer, D., Wells, T.A., Hahn, T.R., Park, H.J., and Bhoo, S.H. (1996) Light Signal Transduction Mediated By Phytochromes - Preliminary Studies and Possible Approaches. *Indian J. Biochem. & Biophys.*, **33**, 1-19.
- Sprenger, W.W., Hoff, W.D., Armitage, J.P., and Hellingwerf, K.J. (1993) The Eubacterium *Ectothiorhodospira-Halophila* Is Negatively Phototactic, With a Wavelength Dependence That Fits the Absorption Spectrum Of the Photoactive Yellow Protein. *J. Bacteriol.*, **175**, 3096-3104.
- Stock, J.B., Surette, M.G., Levit, M., and Park, P. (1995) Two-component signal transduction systems: Structure-function relationships and mechanisms of catalysis. In *Two-Component Signal Transduction*. Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (eds), Washington, DC, American Society for Microbiology.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, **185**, 60-89.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 479-506,CP474.
- Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmid, R. (1969) Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6388-6393.
- Terauchi, K., Montgomery, B.L., Grossman, A.R., Lagarias, J.C., and Kehoe, D.M. (2004) RcaE is a complementary chromatic adaptation photoreceptor required for green and red light responsiveness. *Mol. Microbiol.*, **51**, 567-577.
- Terry, M.J., Wahleithner, J.A., and Lagarias, J.C. (1993) Biosynthesis of the Plant Photoreceptor Phytochrome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **306**, 1-15.
- Terry, M.J., McDowell, M.T., and Lagarias, J.C. (1995) (3Z)- and (3E)-Phytochromobilin are Intermediates in the Biosynthesis of the Phytochrome Chromophore. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11111-11118.
- Timberlake, W.E. (1991) Temporal and spatial controls of *Aspergillus* development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1**, 351-357.
- Tooley, A.J., Cai, Y.A., and Glazer, A.N. (2001) Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycocyanin holo-a subunit in a heterologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 10560-10565.

- Vasil, M.L., and Ochsner, U.A. (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.*, **34**, 399-413.
- Vierstra, R.D., and Davis, S.J. (2000) Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **11**, 511-521.
- Wagner, J.R., Brunzelle, J.S., Forest, K.T., and Vierstra, R.D. (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature*, **438**, 325-331.
- Wang, H., Ma, L., Habashi, J., Li, J., Zhao, H., and Deng, X.W. (2002) Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome A pathway mutants in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **32**, 723-733.
- Wegele, R., Tasler, R., Zeng, Y., Rivera, M. and Frankenberg-Dinkel, N. (2004) The hemeoxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 45791-45802.
- Wilks, A., and Schmitt, M.P. (1998) Expression and characterization of a heme oxygenase (Hmu O) from *Corynebacterium diphtheriae* - Iron acquisition requires oxidative cleavage of the heme macrocycle. *J. Biol. Chem.*, **273**, 837-841.
- Wilks, A. (2002) Heme Oxygenase: Evolution, Structure and Mechanism. *Antioxidants and Redox Signaling*, **4**, 603-614.
- Wong, Y.S., McMichael, R.W., and Lagarias, J.C. (1989) Properties of A Polycation-Stimulated Protein Kinase Associated with Purified *Avena* Phytochrome. *Plant Physiol.*, **91**, 709-718.
- Wu, S.-H., McDowell, M.T., and Lagarias, J.C. (1997) Phycocyanobilin is the Natural Chromophore Precursor of Phytochrome from the Green Alga *Mesotaenium caldariorum*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 25700-25705.
- Yeh, K.C., Wu, S.H., Murphy, J.T., and Lagarias, J.C. (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science*, **277**, 1505-1508.
- Yeh, K.C., and Lagarias, J.C. (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 13976-13981.
- Yoshihara, S., Suzuki, F., Fujita, H., Geng, X.X., and Ikeuchi, M. (2000) Novel putative photoreceptor and regulatory genes required for the positive phototactic movement of the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1299-1304.

- Zhang, X., Migita, C.T., Sato, M., Sasahara, M., and Yoshida, T. (2005) Protein expressed by the ho2 gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is a true heme oxygenase. Properties of the heme and enzyme complex. *FEBS Lett.*, **272**, 1012-1022.
- Zhu, W.M., Wilks, A., and Stojiljkovic, I. (2000) Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the hemO gene of *Neisseriae* is a heme oxygenase. *J. Bacteriol.*, **182**, 6783-6790.

Anhang 1

The hemeoxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*

(Wegele *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 45791-45802.)



## The Heme Oxygenase(s)-Phytochrome System of *Pseudomonas aeruginosa*\*

Received for publication, July 22, 2004, and in revised form, August 11, 2004  
Published, JBC Papers in Press, August 15, 2004, DOI 10.1074/jbc.M408303200

Rosalina Wegele‡, Ronja Tasler‡, Yuhong Zeng§, Mario Rivera§,  
and Nicole Frankenberg-Dinkel‡¶

From the ‡Institute for Microbiology, Technical University Braunschweig, Spielmannstrasse 7, 38106 Braunschweig, Germany and the §Department of Chemistry, University of Kansas, Lawrence, Kansas 66045-7582

For many pathogenic bacteria like *Pseudomonas aeruginosa* heme is an essential source of iron. After uptake, the heme molecule is degraded by heme oxygenases to yield iron, carbon monoxide, and biliverdin. The heme oxygenase PigA is only induced under iron-limiting conditions and produces the unusual biliverdin isomers IX $\beta$  and IX $\delta$ . The gene for a second putative heme oxygenase in *P. aeruginosa*, *bphO*, occurs in an operon with the gene *bphP* encoding a bacterial phytochrome. Here we provide biochemical evidence that *bphO* encodes for a second heme oxygenase in *P. aeruginosa*. HPLC,  $^1\text{H}$ , and  $^{13}\text{C}$  NMR studies indicate that BphO is a “classic” heme oxygenase in that it produces biliverdin IX $\alpha$ . The data also suggest that the overall fold of BphO is likely to be the same as that reported for other  $\alpha$ -hydroxylating heme oxygenases. Recombinant BphO was shown to prefer ferredoxins or ascorbate as a source of reducing equivalents *in vitro* and the rate-limiting step for the oxidation of heme to biliverdin is the release of product. In eukaryotes, the release of biliverdin is driven by biliverdin reductase, the subsequent enzyme in heme catabolism. Because *P. aeruginosa* lacks a biliverdin reductase homologue, data are presented indicating an involvement of the bacterial phytochrome BphP in biliverdin release from BphO and possibly from PigA.

In the presence of a suitable electron donor the enzyme heme oxygenase (HO,<sup>1</sup> EC 1.14.99.3) catalyzes the oxidative degradation of heme to yield equimolar amounts of biliverdin (BV), iron, and CO (see Fig. 1). In the well studied eukaryotic HOs, NADPH and NADPH-cytochrome P450 reductase serve as the electron donor (1, 2). Bacterial HOs have only recently been described, and the HO from *Corynebacterium diphtheriae* (HmuO) was among the first ones to be discovered (3). In *C. diphtheriae* the HO reaction is utilized to release iron from heme under patho-

genic (*i.e.* free-iron limiting) conditions (3). In fact, the breakdown of heme to mine iron is thought to be the major function of HOs from pathogenic organisms, thus allowing them to overcome the low concentrations of free-iron necessary for successful colonization (infection). Their function in iron utilization has been shown for HOs from several pathogenic bacteria, including *Neisseria meningitidis* (HemO), *Corynebacterium ulcerans* (HmuO), and *Staphylococcus aureus* (IsdG/I) (4–6). One of the most interesting bacterial HOs was recently identified in the Gram-negative opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. The *pigA* gene, originally identified in a screen for iron-regulated genes, was shown to encode a protein with homology to the neisserial HOs (7). The gene, which is part of a five-gene operon (*pigA–E*), is under the control of the global iron regulator Fur (ferric uptake regulator) and is only expressed under iron-limiting conditions (8). Unlike all other eu- and prokaryotic HOs that regiospecifically cleave the  $\alpha$ -meso carbon of heme, PigA targets the  $\beta$ - and  $\delta$ -meso carbons of the heme macrocycle (7) (Fig. 1). The unusual production of  $\beta$ - and  $\delta$ -BV was shown to be due to an unusual seating of the substrate heme in the active site pocket of PigA (9). The purpose for the production of these BV isomers and their fate in *P. aeruginosa*, however, is currently unknown. In addition to their function in iron utilization bacterial HOs are also involved in the first step of phycobilin biosynthesis. These linear tetrapyrrole molecules are precursors of the chromophores for the cyanobacterial light-harvesting phycobiliproteins and the photoreceptor phytochrome. Phytochromes are traditionally known as biliprotein photoreceptors in plants but have recently also been discovered in bacteria (10). Unlike plant and cyanobacterial phytochromes, which carry a phytochromobilin or phycocyanobilin chromophore, bacteriophytochromes (BphPs) from non-photosynthetic prokaryotes have been shown to utilize a BV chromophore (11). *P. aeruginosa* was among the first non-photosynthetic bacteria identified to harbor a gene encoding for a BphP. This bacteriophytochrome is a typical sensor kinase of a prokaryotic two-component signaling system. The *bphP* gene is located in an operon downstream from a *bphO* gene, which encodes a putative HO. So far, no gene encoding for the corresponding response regulator has been identified in *P. aeruginosa*. Herein we present the first biochemical and biophysical evidence that *bphO* encodes for a functional HO that oxidizes heme to BV IX $\alpha$ . Because *P. aeruginosa* is the first known organism to encode two functional HOs, each capable of oxidizing heme to a different BV isomer, their involvement in phytochrome chromophore biosynthesis has been investigated and will also be discussed.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### Reagents

All chemicals, including glutathione-agarose, were purchased from Sigma (Munich, Germany) and were American Chemical Society grade or better. Restriction enzymes were from Invitrogen (Cleveland, OH).

\* This work was supported by the Emmy-Noether-Program of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and funds from the Fonds der Chemischen Industrie (to N.F.-D.) and by Grant GM 50503 from the National Institutes of Health (to M.R.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Tel.: 49-531-391-5815; Fax: 49-531-391-5854; E-mail: n.frankenberg@tu-bs.de.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: HO, heme oxygenase; BR, bilirubin; BV, biliverdin; BVR, biliverdin reductase; Fd(s), ferredoxin(s); Fur, ferric uptake regulator; GPC, gel permeation chromatography; GST, glutathione S-transferase; (h)CPR, (human) cytochrome P450 reductase; HPLC, high performance liquid chromatography; ALA,  $\delta$ -amino-levulinic acid; HMQC, heteronuclear multiple quantum coherence; TES, 2-[[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]amino]ethanesulfonic acid; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy.

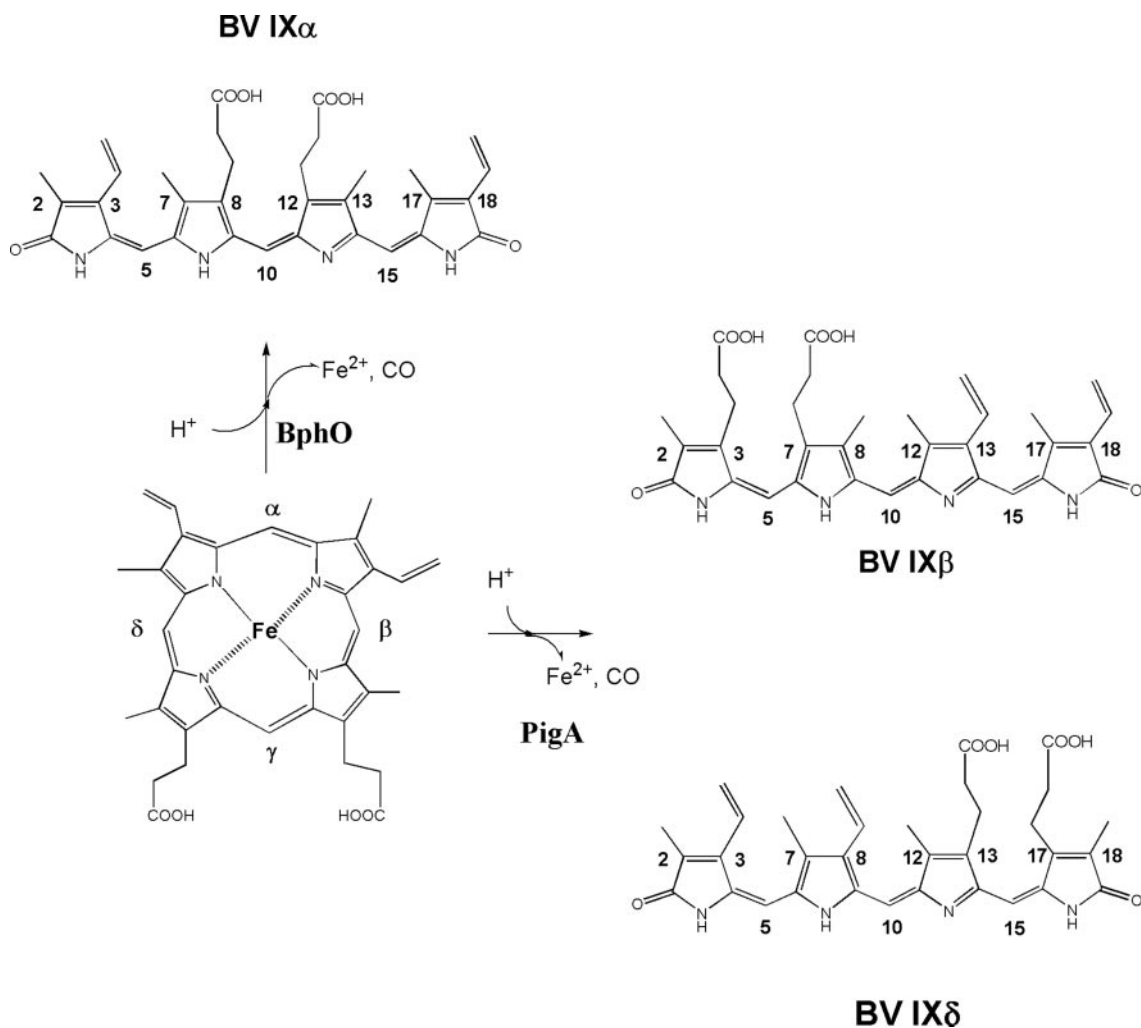


FIG. 1. **Reactions catalyzed by *P. aeruginosa* heme oxygenases.** Two types of bacterial HOs are known so far that show different regiospecificities toward the cleavage of the heme macrocycle. Most HOs cleave the heme at the  $\alpha$ -meso carbon position yielding biliverdin IX $\alpha$ . The only HO showing a different regiospecificity is PigA from *P. aeruginosa*, which oxidizes heme to  $\beta$ - and  $\delta$ -biliverdin.

MasterTaq<sup>TM</sup> was purchased from Eppendorf Scientific (Westbury, NY). HPLC-grade acetone and 80% formic acid were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). The expression vector pGEX-6P-1 and PreScission<sup>TM</sup> protease were obtained from Amersham Biosciences. Centricon-10 concentrator devices were purchased from Amicon (Beverly, MA). Cytochrome P450 reductase was from Merck Biosciences (Bad Soden, Germany), all ferredoxins, ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase, and catalase were from Sigma.

#### Construction of Expression Vectors

*P. aeruginosa* PAO I *pigA* and *bphO* (PA4116) genes were amplified from chromosomal DNA via polymerase chain reaction with a hot start protocol using the following primers, which contained the indicated and underlined restriction sites: *pigABam*Hifwd: 5'-CGGGATCCGATACCTGGCCCCCTGAATCC-3', *pigAXho*Irev: 5'-CCGCTCGAGTCAGGCGAAGGTACGCTCCAG-3'; *bphOBam*Hifwd: 5'-GCGGATCCATCTCCCATCTCCATCGCCAGC-3', *bphOSma*Irev: 5'-TCCCCCGGGTCAGGCTTCGTCGAGAACCATC-3'. The polymerase chain reaction products were then cut with the indicated enzymes and inserted into similarly restricted pGEX-6P-1. The integrity of the plasmid constructs was verified by complete DNA sequence determination of the insert (Davis Sequencing, Davis, CA). Both constructs placed the heme oxygenase gene downstream of and in frame with the glutathione *S*-transferase (*GST*) gene of *Schistosoma japonicum* under the control of a *P*<sub>tac</sub> promoter. A recognition sequence for PreScission protease is located upstream of the cloned gene. Proteolytic cleavage yields the native protein with a small N-terminal extension.

#### Expression and Purification

Expression and purification were performed according to instructions supplied by the manufacturer (Amersham Biosciences) and as

described before (12). Recombinant *P. aeruginosa* BphP was expressed using a *tet* promoter-driven Strep-tag system (13) (IBA, Göttingen, Germany). Details of the cloning and purification will be published elsewhere.

#### Protein Determination

Protein concentration was determined by the Bradford method with bovine serum albumin as a standard or by measuring the absorbance at 280 nm and using the calculated  $\epsilon_{280 \text{ nm}}$  for each individual protein (14, 15).

#### Spectrophotometric Analysis of Biliverdin Production

The formation of BV IX $\alpha$  was detected spectrophotometrically at 450 nm by converting it to bilirubin IX $\alpha$  (BR) using recombinant rat biliverdin reductase (BVR) (16). An aliquot of  $\sim 5 \mu\text{g}$  of crude recombinant rat BVR (expression clone was a gift of Dr. J. C. Lagarias, University of California at Davis) was added to the purified BphO-BV complex in 25 mM HEPES-KOH, 100 mM KCl, 10% glycerol, pH 7.5, and the reaction was started by adding an NADPH-regenerating system containing 6.5 mM glucose 6-phosphate, 0.82 mM NADP<sup>+</sup>, and 1.1 unit/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase.

#### Reconstitution of BphO with Heme

The BphO-heme complex was prepared according to protocols previously described for heme-heme oxygenase complexes (3, 17). Heme was added to purified protein at a final ratio 3:1 heme:protein. Aliquots of heme (1.0–30  $\mu\text{M}$ ) were added to the cuvette containing 10  $\mu\text{M}$  BphO and to the reference cuvette at room temperature. Spectra were recorded 5 min after heme addition.

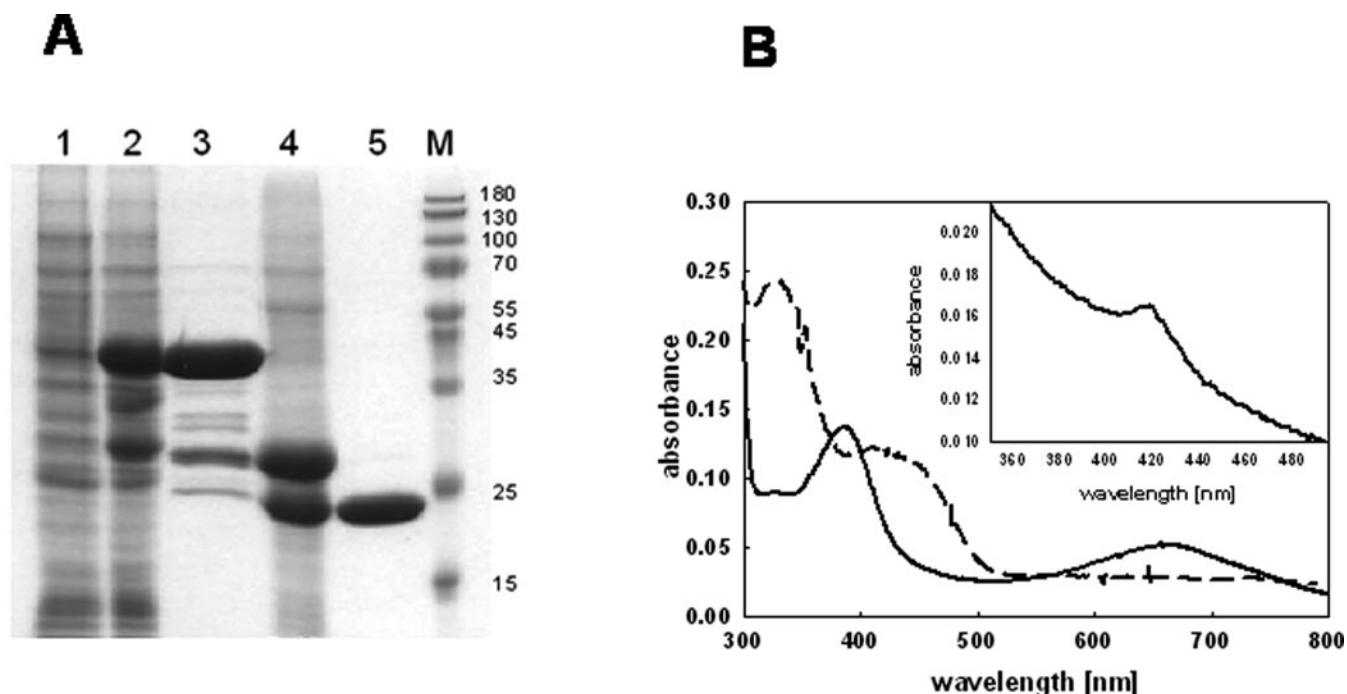


FIG. 2. A, affinity purification of recombinant BphO. SDS-PAGE analysis of whole cell protein extracts before (lane 1) and after (lane 2) induction with IPTG. Lane 3 shows GST-BphO after glutathione agarose affinity chromatography; lane 4, PreScission Protease cleaved GST-BphO; lane 5, BphO after the second glutathione-agarose affinity chromatography; lane M, molecular mass standards. Numbers on the right indicate positions of molecular weight markers. B, absorbance spectroscopy of purified BphO. Electronic absorption spectra of recombinant BphO expressed and purified under aerobic conditions (solid line) and after addition of rat BVR (dashed line). The insert shows the BphO absorbance spectrum after anaerobic expression and purification.

#### Determination of the Extinction Coefficient for the BphO-heme Complex

The millimolar extinction coefficient at 409 nm for the BphO-heme complex was determined using the pyridine hemochrome method (2, 18). The isolated BphO-heme complex was converted to a pyridine hemochrome in a 500- $\mu$ l sample volume by the addition of 62.5  $\mu$ l pyridine and 62.5  $\mu$ l of 0.5 N NaOH solution. The spectrum of the oxidized pyridine hemochrome was recorded. An excess of dithionite was added, and the spectrum of the reduced ferrous pyridine hemochrome was recorded. The spectrum of the reduced form minus the spectrum of the oxidized form was calculated at 557 nm. The concentration of heme was determined from the extinction coefficient using an  $\epsilon_{405 \text{ nm}}$  value of 34,530  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

#### Spectroscopic Characterization of the Catalytic Turnover of the BphO-heme Complex

The BphO-heme complex (1:3) was prepared as described above and applied to a hydroxylapatite column (0.5  $\times$  1.0 cm) equilibrated with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). The column was washed with the same buffer, and the protein eluted in 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). The fractions containing the BphO-heme complex were dialyzed against 25 mM HEPES-KOH containing 100 mM KCl and 10% glycerol (pH 7.5).

The standard assay (0.5-ml final volume) contained 10  $\mu$ M BphO-heme, 0.15 mg/ml bovine serum albumin, 4.6  $\mu$ M ferredoxin (*Spinacea*, *Porphyrin*, and *Clostridium*), 0.025 unit/ml spinach ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in 25 mM HEPES-KOH buffer (pH 7.5). The reaction was started by addition of the NADPH-regenerating system listed above. Spectral changes between 300 and 800 nm were monitored for 30 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Sodium ascorbate or Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was added to a final concentration of 5 mM unless otherwise noted. The reaction in the presence of human cytochrome P450 reductase (hCPR) was carried out as described previously by Wilks and Schmitt (3). When appropriate, catalase from *Aspergillus niger* was added to reaction cuvettes at a ratio of catalase:BphO-heme 0.5:1 immediately before the addition of reductant.

#### HPLC Analysis of BphO Reaction Products

BphO/PigA assay mixtures were loaded onto a Waters (Milford, MA) C<sub>18</sub> Sep-Pak Light cartridge preconditioned as follows: 3-ml wash with

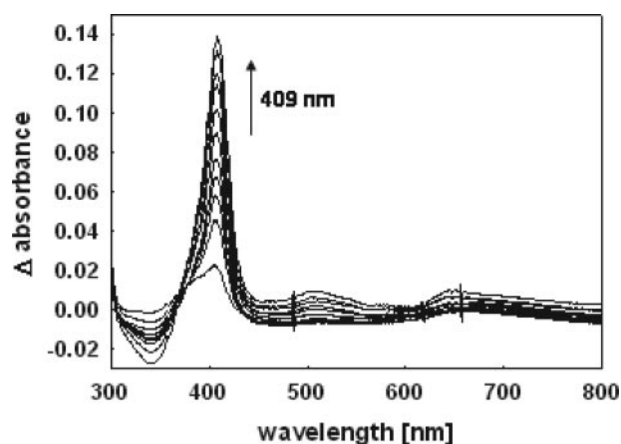


FIG. 3. Absorption difference spectra of heme binding to BphO. Increasing amounts of heme (1–30  $\mu$ M) were added both to the reference and sample cuvettes.

acetonitrile to wet the Sep-Pak, 3-ml wash with MilliQ water, and 3-ml wash with 50 mM 4-methylmorpholine/glacial acetic acid (pH 7.7). After the sample was loaded onto the Sep-Pak, it was washed with 3 ml of 4-methylmorpholine/glacial acetic acid (pH 7.7) followed by 3 ml of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid. The tetrapyrroles were then eluted from the Sep-Pak using 2 ml of 100% acetonitrile. The eluate was dried using a Speed-Vac lyophilizer, and the dried samples were analyzed by HPLC. Samples were first dissolved in 10  $\mu$ l of Me<sub>2</sub>SO and then diluted with 200  $\mu$ l of the HPLC mobile phase. Following brief centrifugation and filtration through a 0.45- $\mu$ m polytetrafluoroethylene syringe filter, bilins were resolved by reversed phase chromatography using an Agilent Technologies 1100 liquid chromatograph. The HPLC column used for all of the analyses was a 4.6-  $\times$  250-mm Phenomenex Ultracarb 5- $\mu$ m ODS20 analytical column with a 4.6-  $\times$  30-mm guard column of the same material. The mobile phase consisted of acetonitrile:20 mM formic acid (50:50 by volume), and the flow rate was 0.6 ml/min. Eluates were monitored at 650 and 380 nm using an Agilent Technologies 1100 series diode array detector.



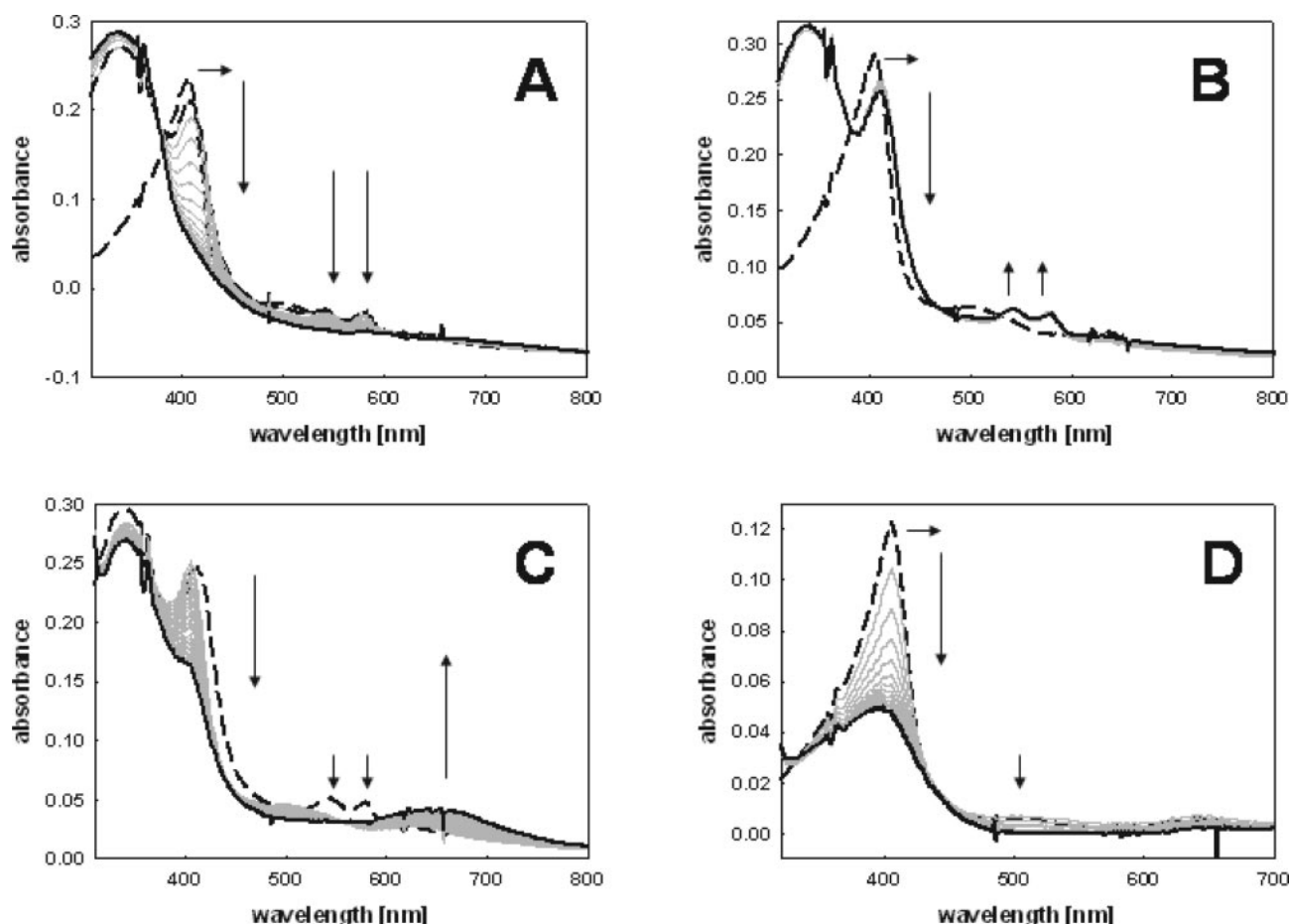


FIG. 4. Spectroscopic characterization of the catalytic turnover of the BphO-heme complex in the presence of spinach ferredoxin. A, catalytic turnover of BphO-heme in the presence of spinach Fd. The oxyferrous complex is formed immediately and degraded to ferric-BV. B, same reaction as A but in the presence of catalase. The reaction is arrested at the oxyferrous complex stage. C, same reaction as B. After addition of ascorbate the oxyferrous complex is further degraded to yield iron-free BV. D, catalytic turnover of BphO-heme in the presence of 5 mM sodium ascorbate. Initial spectra are shown in *dashes*, final spectra in *bold*. Spectra during this conversion are *light gray*. The direction of spectral changes are indicated by *arrows*.

#### NMR Spectroscopic Characterization of BphO

**Preparation of BphO Reconstituted with  $^{13}\text{C}$ -Labeled Heme**— $^{13}\text{C}$ -Labeled  $\delta$ -aminolevulinic acids (ALAs) were used as biosynthetic precursors for the preparation of protoheme IX (heme).  $\delta$ -[5- $^{13}\text{C}$ ]Amino-levulinic acid ([5- $^{13}\text{C}$ ]ALA) and [1,2- $^{13}\text{C}$ ]ALA were synthesized utilizing methods described previously (19). Heme labeled with  $^{13}\text{C}$  was obtained utilizing previously reported methodology (9, 20–22) developed to take advantage of the fact that the first committed precursor in heme biosynthesis is ALA (23). Thus,  $^{13}\text{C}$ -labeled heme, which was biosynthesized in *Escherichia coli* upon addition of suitably labeled ALA, was trapped by simultaneously expressing rat liver outer mitochondrial membrane cytochrome  $b_5$ . The details of the biosynthetic protocol, which entail the expression and purification of outer mitochondrial membrane cytochrome  $b_5$  harboring  $^{13}\text{C}$ -labeled heme, have been presented previously (9, 20–22).  $^{13}\text{C}$ -Labeled heme was extracted from outer mitochondrial membrane cytochrome  $b_5$  as follows: pyridine (15 ml) was added to 2.5 ml of 1 mM outer mitochondrial membrane cytochrome  $b_5$  in phosphate buffer ( $\mu = 0.10$ , pH = 7.0). Slow addition of chloroform, typically 10–12 ml, resulted in the precipitation of the polypeptide, while maintaining the pyridine hemochrome in the supernatant. The latter was subsequently separated from the denatured polypeptide by centrifugation and then dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . The desiccant was removed by filtration, and the filtered pyridine-chloroform solution was transferred to a round bottom flask, where it was concentrated to dryness in a rotary evaporator. Finally, the solid was redissolved in 1.5 ml of  $\text{Me}_2\text{SO}$ . BphO was reconstituted with a freshly prepared solution of  $^{13}\text{C}$ -labeled heme by titrating it into a 25-ml solution of phosphate buffer ( $\mu = 0.10$ , pH = 7.0) containing  $\sim 2 \mu\text{mol}$  of BphO until the ratio  $A_{280}/A_{\text{Soret}}$  no longer changed. The resultant solution containing the reconstituted enzyme was incubated at 4 °C overnight, then purified by size exclusion chromatography with the aid of a

Sephadex G-50 column (90  $\times$  2.6 cm inner diameter) equilibrated and eluted with 10 mM phosphate buffer, pH 7.0 at 4 °C. Fractions containing pure protein were concentrated in Amicon centrifugal concentrators to  $\sim 1$  ml and then transferred to smaller Centricon concentrators to exchange the protein into deuterated phosphate buffer, pH 7.0, not corrected for the deuterium isotope effect.

**NMR Spectroscopy**— $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were acquired on a Varian Unity Inova spectrometer operating at frequencies of 599.740 ( $^1\text{H}$ ) and 150.817 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz, respectively.  $^1\text{H}$  spectra were referenced to the residual water peak at 4.8 ppm, and  $^{13}\text{C}$  spectra were referenced to an external solution of dioxane (60% v/v in  $\text{D}_2\text{O}$ ) at 66.66 ppm. Proton spectra were acquired with pre-saturation of the residual water peak over 10,000 data points, with a spectral width of 24 kHz, a 150-ms acquisition time, a 200-ms relaxation delay, and 1024 scans.  $^{13}\text{C}$  spectra were collected over 12,000 data points, with a spectral width of 60 kHz, a 100-ms acquisition time, a 25-ms relaxation delay, and 400,000 scans. HMQC spectra were typically acquired with spectral widths of 24 kHz for  $^1\text{H}$  and 50 kHz for  $^{13}\text{C}$  and a 200-ms relaxation delay. HMQC spectra obtained from samples containing BphO reconstituted with heme labeled at the methyl, propionate- $\beta$ , and vinyl- $\beta$  carbons were acquired with refocusing delays based on  $^1J_{\text{CH}} = 140$  Hz, whereas spectra obtained from BphO reconstituted with heme labeled at the meso carbons were acquired with  $^1J_{\text{CH}} = 180$  Hz. Data were collected as an array of 2,000  $\times$  128 points with 512 scans per  $t_1$  increment and processed by zero filling once in  $t_2$  and twice in  $t_1$  to obtain an 8,000  $\times$  8,000 matrix. This was apodized with a 90°-shifted squared sine bell function and Fourier transformed. Water-eliminated Fourier transform-NOESY (24, 25) spectra were acquired with 24 kHz in both dimensions, 2,000 data points in  $t_2$ , 256 increments in  $t_1$ , 352 scans per  $t_1$  increment, and (typically) a 40-ms mixing time. The data were processed by zero filling

in both dimensions to obtain an  $8,000 \times 8,000$  matrix, apodized with 90°-shifted squared sine bell, and Fourier transformed.

### Gel Permeation Chromatography

An Amersham Biosciences Superdex 200 HR10/30 gel permeation chromatography column was equilibrated in 50 mM TES-KOH buffer, pH 7.5, containing 100 mM KCl and 10% (v/v) glycerol (GPC buffer) at a flow rate of 0.4 ml/min. Standards with known  $M_r$  (i.e.  $\beta$ -amylase 200,000; alcohol dehydrogenase 150,000; bovine serum albumin 66,000; carbonic anhydrase 29,000; and cytochrome *c* 12,600) were applied to the column (100  $\mu$ g), and their elution volumes were determined spectroscopically at 280 nm. 10  $\mu$ M BphP and 10  $\mu$ M estimated BV (bound to BphO) were applied to the column and chromatographed under conditions identical to those used for the standard proteins. All samples were also monitored at 650 nm for BV detection.

### Phytochrome Difference Spectroscopy

To test chromophore assembly of BphP *in vitro*, 20  $\mu$ M recombinant apo-BphP was incubated with 40  $\mu$ M chromophore or BphO (PigA)·BV

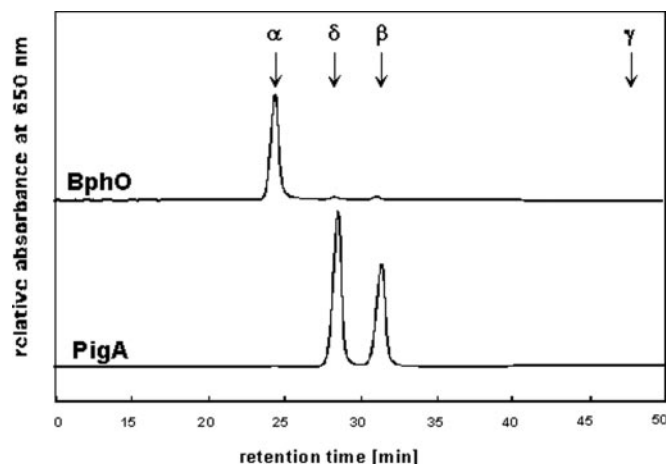


FIG. 5. HPLC analysis of the reaction products of the two *P. aeruginosa* heme oxygenases. Purified recombinant BphO and PigA were assayed for HO activity. Bilins were extracted from the incubation mixture using a SepPak C<sub>18</sub> reversed phase cartridge and analyzed by reversed phase HPLC as described under "Experimental Procedures." The HPLC solvent was acetone:20 mM formic acid (50:50, v/v), and the eluate was monitored at 650 nm. The *top trace* shows the metabolites obtained by the BphO reaction; the *bottom trace* shows the products of the PigA reaction. Retention times for the four BV IX isomers are indicated by arrows.

complex for 30 min at room temperature in darkness. Absorbance spectra were obtained after 3-min incubation with red light at 630 nm ( $P_r$  spectrum) and far red light at 750 nm ( $P_r$  spectrum), respectively, in a volume of 500  $\mu$ l (50 mM HEPES-KOH, 20 mM KCl, pH 8.0) using an Agilent Technologies 8453 Value Analysis UV-Visible System. Difference spectra ( $P_r - P_{fr}$ ) were calculated.

### Coupled Oxidation of Heme

The four isomers of BV IX were obtained through coupled oxidation of heme in pyridine as described before (26). The four BV isomers were separated using a semi-preparative reversed phase HPLC of the same material as described above, except that the flow rate was 2 ml/min.

## RESULTS

**Expression and Purification of Recombinant *P. aeruginosa* Heme Oxygenases**—The *P. aeruginosa* *pigA* and *bphO* genes were expressed using a *tac* promoter-driven N-terminal GST fusion expression system. All the reported results were obtained for recombinant BphO unless otherwise noted. Recombinant PigA and BphO could be purified to ~99% homogeneity, as shown in Fig. 2A for BphO. One single band was obtained on SDS-PAGE migrating at ~23,000, which corresponds to the predicted relative molecular weight calculated from the amino acid composition ( $M_r = 21,465$ ). One liter of bacterial culture typically yielded 10 mg of purified BphO. Interestingly, expression of recombinant protein resulted in the development of a bright green color (Fig. 2B as seen by absorption at 650 nm) indicating the production of BV during the recombinant expression of BphO. The produced BV appears to have a high affinity toward BphO, because the BphO·BV complex remained stable throughout the entire purification process; however, the bound BV can be replaced by the substrate heme (see below). The production of BV was further confirmed by its conversion to bilirubin (BR) upon addition of rat biliverdin reductase (BVR). Hence, addition of BVR and NADPH to the purified BphO·BV complex resulted in the conversion of the bound BV to BR, which was accompanied by a color change from green to yellow and by the appearance of a peak at 450 nm (Fig. 2B). For additional confirmation that the production of BV was due to the action of BphO during expression, BphO was expressed under anaerobic culture conditions using nitrate as a terminal electron acceptor. Because any known HO reaction is oxygen-dependent, no formation of BV should be obtained. As expected, no color formation was observed during anaerobic expression

TABLE I  
Tested reductants in the BphO assay

Reductant	Concentration	Visible intermediates	Final product
Ferredoxin spinach [2Fe-2S]	4.6 $\mu$ M	Oxyferrous complex ( $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ ) (545 nm, 579 nm)	Ferric-biliverdin ( $\text{Fe}^{3+}\text{-BV}$ ) <sup>a</sup>
Ferredoxin <i>Clostridium</i> [4Fe-4S]	4.6 $\mu$ M	$\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (545 nm, 579 nm)	$\text{Fe}^{3+}\text{-BV}$
Ferredoxin <i>Porphyra</i> [2Fe-2S]	4.6 $\mu$ M	$\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (545 nm, 579 nm)	$\text{Fe}^{3+}\text{-BV}$
Sodium ascorbate	5 mM	BphO-heme complex degradation	$\text{Fe}^{3+}\text{-BV}$
Trolox	5 mM	ND <sup>b</sup>	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 $\mu$ M	ND	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300 $\mu$ M	$\text{Fe}^{3+}\text{-verdoheme}$	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300 $\mu$ M		
Catalase		ND	
Ferredoxin spinach	4.6 $\mu$ M	BphO-heme complex degradation	BV
Ascorbate	5 mM		
Ferredoxin <i>Clostridium</i>	4.6 $\mu$ M	BphO-heme complex degradation	BV
Ascorbate	5 mM		
Ferredoxin <i>Porphyra</i>	4.6 $\mu$ M	BphO-heme complex degradation	BV
Ascorbate	5 mM		
Ferredoxin spinach	4.6 $\mu$ M	BphO-heme complex degradation	BV
Trolox	5 mM		
Ferredoxin spinach	4.6 $\mu$ M		
Catalase	5 $\mu$ M		$\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$
Ascorbate (later)	5 mM		BV
Human cytochrome P450 reductase	2.5 $\mu$ M	ND	

<sup>a</sup> BV, biliverdin;  $\text{Fe}^{3+}\text{-BV}$ , ferric-biliverdin;  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ , oxyferrous complex.

<sup>b</sup> ND, nothing detected.

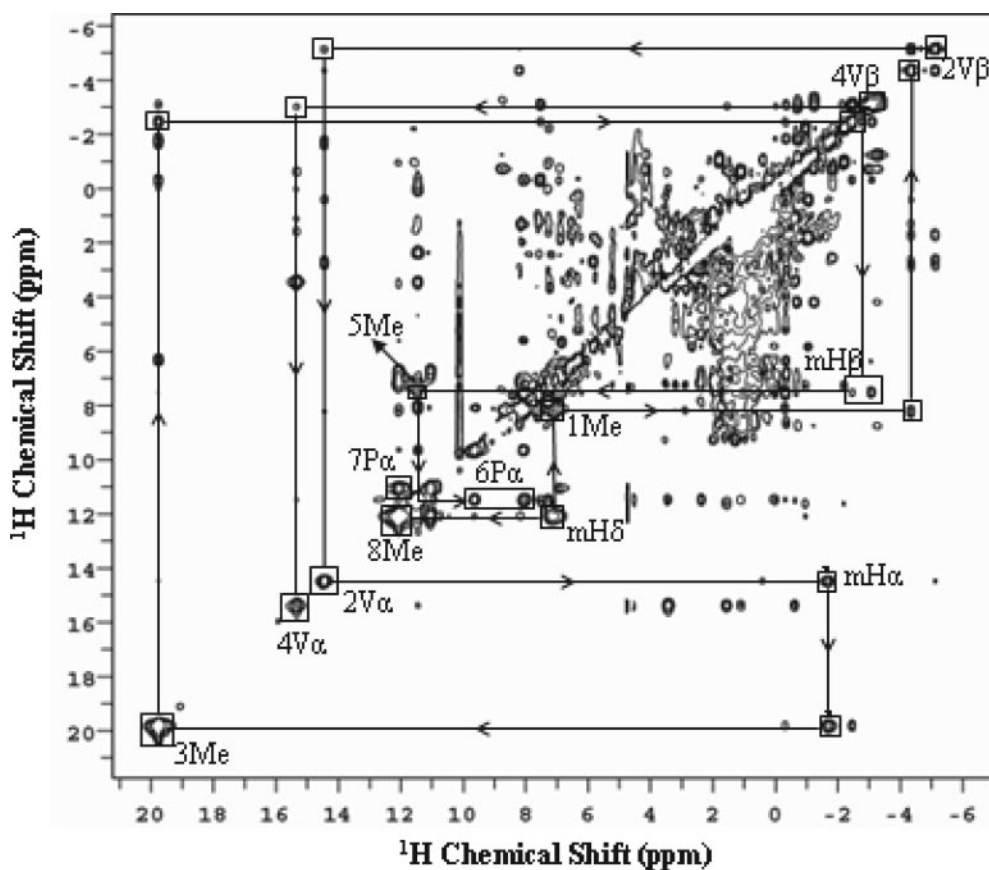


FIG. 6. **Water-eliminated Fourier transform-NOESY (30 °C) spectrum of BphO-CN.** Resonance assignments for heme substituents are obtained by following the dipolar connectivities starting from meso- $H_\delta$  at 7.19 ppm and walking through the macrocycle in two directions: 1) meso- $H_\delta \rightarrow 1\text{Me} \rightarrow 2V_\alpha \rightarrow 2V_\beta \rightarrow \text{meso-}H_\alpha \rightarrow 3\text{Me} \rightarrow 4V_\beta \rightarrow \text{meso-}H_\beta \rightarrow 5\text{Me} \rightarrow 6P_\alpha$ . The  $4V_\alpha$  resonance can also be identified by its cross-peak with  $4V_\beta$ ; 2) meso- $H_\delta \rightarrow 8\text{Me} \rightarrow 7P_\alpha$ .

and purification, but the spectrum of purified recombinant BphO showed a small peak around 420 nm suggesting the formation of a BphO-heme complex (Fig. 2B, inset). These observations taken together demonstrated that recombinant BphO is already active in *E. coli*, where it must interact with a reducing agent. The nature of this reductant, however, remains to be elucidated.

**Heme Binds to BphO**—The formation of a BphO-heme complex was determined by difference spectroscopy. To this end, equal aliquots of hemin were added to the sample cuvette containing the BV complex of BphO in buffer and to the reference cuvette containing only buffer. Addition of hemin to BphO resulted in the replacement of BV, which was evident from a change in color of the solution, from green to brownish red. The electronic absorption spectrum of the BphO-heme complex is different from that of the BphO-BV complex and from that of free heme in solution (Fig. 3). The BphO-heme complex has a Soret band at 409 nm, which is close to that reported for other bacterial HO-heme complexes (27). Attempts to calculate the dissociation constant ( $K_d$ ) did not result in reliable data, which is most likely a consequence of competition between BV and hemin for the binding site in BphO. Efforts to remove the relatively tightly bound BV from BphO prior to the titration experiments failed. The extinction coefficient of the BphO-heme complex was found to be  $97.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a value that appears to be the lowest reported for a bacterial HO.

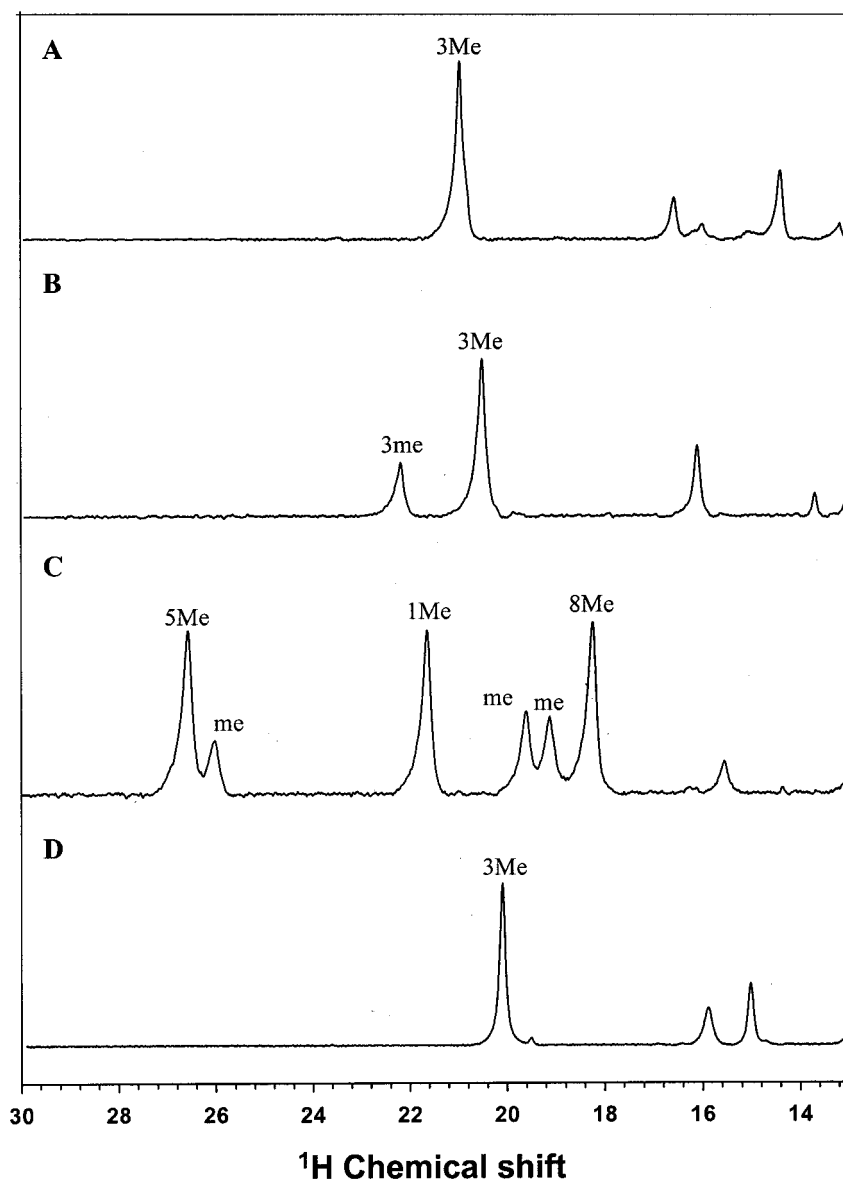
**Spectroscopic Characterization of the Catalytic Turnover of the BphO-heme Complex**—The catalytic turnover of the ferric BphO-heme complex in the presence of spinach ferredoxin and a ferredoxin reductase system (*i.e.* ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductase and a NADPH-regenerating system) was meas-

TABLE II  
 $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts (ppm) from heme substituents in cyanide-inhibited BphO at 30 °C

	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1Me	8.41	-18.43
3Me	19.73	-45.17
5Me	11.42	-24.64
8Me	12.03	-28.91
2V $\alpha$	14.41	
2V $\beta$	-4.40, -5.17	188.27
4V $\alpha$	15.31	
4V $\beta$	-2.25, -2.51	148.63
Meso- $\alpha$	-1.35	51.89
Meso- $\beta$	8.00	3.37
Meso- $\gamma$		
Meso- $\delta$	7.19	17.78
6P $\alpha$	8.04, 9.65	
6P $\beta$	1.13, -0.56	116.97
7P $\alpha$	11.01, 7.31	
7P $\beta$	-1.01, -2.06	109.68

ured spectrophotometrically. In the presence of reduced spinach ferredoxin the BphO-heme complex was immediately converted to the oxyferrous complex, which was accompanied by a shift in the Soret band from 409 to 412 nm and by the appearance of  $\beta/\alpha$ -bands at 545 and 579 nm, respectively (Fig. 4A). Within 30 min the oxyferrous complex was fully degraded to ferric-BV (Fig. 4A). Interestingly, when the reaction mixture contains the hydrogen peroxide scavenger catalase in addition to Fd, to rule out non-enzymatic coupled oxidation of the BphO-heme complex, the reaction proceeded much slower and was arrested at the oxyferrous stage; the latter remained stable over at least 30 min (Fig. 4B). Because it has been reported that

FIG. 7. Downfield portion of the  $^1\text{H}$  NMR spectra of cyanide inhibited HemO (A), HmuO (B), PigA (C), and BphO (D). The presence of only one heme methyl resonance in this region, 3Me, is diagnostic of all known  $\alpha$ -hydroxylating HOs, where the proximal histidine-imidazole plane lies approximately parallel to the  $\beta$ - $\delta$ -meso axis (see Fig. 8). The same region of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PigA, where the heme is rotated in-plane  $\sim 100^\circ$  relative to the  $\alpha$ -biliverdin-producing HOs, shows three heme methyl resonances. These resonances indicate that the proximal histidine-imidazole plane in PigA lies approximately parallel to the  $\alpha$ - $\gamma$ -meso axis (see Fig. 8).



for some bacterial HOs the Fd-dependent conversion of heme to BV requires a second reductant such as ascorbate (28), ascorbate or Trolox was added to the arrested reaction. This resulted in the full conversion of the oxyferrous complex to iron-free BV, as was evident from the development of green color and from the appearance of a peak at 680 nm (Fig. 4C). In comparison, ascorbate by itself supported the oxidation of the BphO-heme complex to ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) BV (Fig. 4D). Addition of catalase to the ascorbate-mediated heme degradation did not alter the reaction.

To distinguish the observed spectral changes from a coupled oxidation reaction, the BphO-heme complex was incubated with 30 or 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectively. Only the high concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  promoted the coupled oxidation reaction, which resulted in the formation of  $\text{Fe}^{3+}$ -verdoheme (Table I). If the same reaction also contained catalase, no heme degradation was observed, which confirmed that in the presence of peroxides heme in the BphO-heme complex was degraded via coupled oxidation.

**Reductant Specificity of BphO**—The reductant specificity of BphO was tested using several commercially available reductants in our assay system. We tested the Fds from *Clostridium* sp. [4Fe-4S], *Porphyra* sp. [2Fe-2S], together with spinach

ferredoxin-NADP $^+$  oxidoreductase as well as human cytochrome P450 reductase (hCPR). All Fds tested were capable of supporting the degradation of the BphO-heme complex, whereas hCPR failed to mediate the oxidation of the BphO-heme complex. Furthermore, sodium ascorbate was a potent reducing partner (as described above). Experiments using a single reductant always resulted in the production of ferric-BV. Only if a second reductant was present iron-free BV was the final product. The results are summarized in Table I.

**HPLC Analysis of the BphO and PigA Reaction Products**—Upon completion of the Fd-mediated degradation of the BphO-heme complex, the reaction products were extracted using  $\text{C}_{18}$  SepPak cartridges and subsequently subjected to reverse phase HPLC. The four BV IX isomers were used as a standard as well as the reaction products of the PigA reaction. Fig. 5 shows a chromatogram confirming that BV IX $\alpha$  is the only product of the BphO reaction, whereas PigA produces the  $\beta$ - and  $\delta$ -isomers of BV IX.

**NMR Spectroscopic Characterization of BphO**—Chemical shifts for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclei originating from heme methyl and meso positions of cyanide-inhibited BphO (BphO-CN) were identified with a combination of one-dimensional non-decoupled  $^{13}\text{C}$  and HMQC spectra, according to the assignment



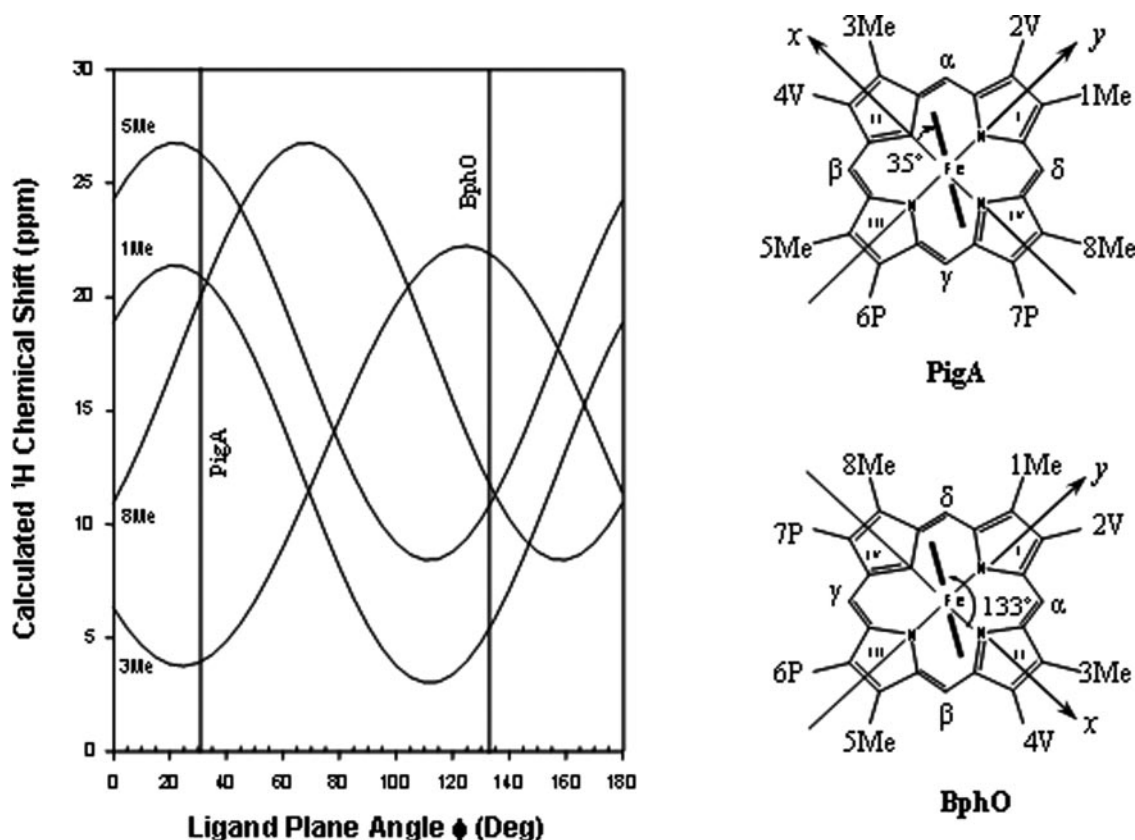


FIG. 8. Plot illustrating the dependence of the heme methyl chemical shifts on the angle  $\phi$  made by the projection of the proximal histidine-imidazole plane and the molecular  $x$ -axis (32, 49). In all  $\alpha$ -biliverdin-producing HOs, including BphO, the proximal histidine-imidazole plane lies nearly parallel to the  $\delta$ - $\beta$ -meso axis (bottom right). The order and position of the heme methyl chemical shifts in BphO indicate that the angle  $\phi$  in this enzyme is  $\sim 133^\circ$  (see plot), a value very similar to that seen in the crystal structures of HmuO (37), HemO (36), and HO-1 (33). The heme methyl chemical shifts of PigA have been used to predict (9) that its heme is rotated in-plane nearly  $100^\circ$  (top right) so that the proximal histidine-imidazole plane lies nearly parallel to the  $\alpha$ - $\gamma$ -meso axis and forms an angle  $\phi$  of  $\sim 35^\circ$ . This prediction was corroborated in the recent crystal structure of PigA (34).

strategies outlined in previous work (9, 21, 22). The  $^1\text{H}$  resonance assignments corresponding to heme substituents were subsequently obtained from the NOESY map shown in Fig. 6. The significance of these assignments (summarized in Table II) is presented below.

It has been proposed that the pattern of paramagnetically affected heme methyl resonances in the  $^1\text{H}$  NMR spectra of HO enzymes is diagnostic of the heme in-plane orientation, and hence regioselectivity of meso carbon oxidation (9, 21). For instance, the cyanide-inhibited forms of  $\alpha$ -biliverdin-producing HO enzymes (HO-CN) exhibit  $^1\text{H}$  NMR spectra with only 1 heme methyl resonance above 12 ppm (3Me). Fig. 7 (A and B) illustrates the downfield portion of the  $^1\text{H}$  NMR spectra of the  $\alpha$ -biliverdin producing HmuO-CN and HemO-CN, respectively, with only the 3Me resonance from its major (3Me) and minor (3me) heme orientational isomer resolved from the diamagnetic envelope of resonances (21, 29). The spectra of the  $\alpha$ -biliverdin-producing human and rat HO-1-CN enzymes are essentially identical to those shown in Fig. 7 (A and B) (30, 31). In comparison, the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PigA-CN, where the heme is rotated in-plane  $\sim 100^\circ$  relative to the heme of the  $\alpha$ -biliverdin-producing enzymes, exhibits three heme methyl resonances from the more abundant heme orientational isomer (5Me, 1Me, and 8Me) and three from the less abundant isomer (me) (9) (see Fig. 7C). It is therefore evident from the resolved portion of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of BphO-CN (Fig. 7D), which only displays the methyl resonance corresponding to 3Me, that this enzyme should oxidize heme to produce  $\alpha$ -biliverdin. Indeed, this prediction based on the diagnostic feature of the downfield resolved  $^1\text{H}$  NMR spectrum is in good agreement with the fact

that assays of heme oxidation regio-selectivity yield only  $\alpha$ -biliverdin.

The plot shown in Fig. 8 permits a straightforward correlation of the observed shifts for the four heme methyl groups as a function of the angle  $\phi$  formed between the axial histidine-imidazole plane and the molecular  $x$ -axis (32). Interpretation of the heme methyl resonance assignments in the context of this plot made it possible to correctly predict an angle  $\phi$  of  $125^\circ$  for the proximal imidazole of human heme oxygenase (32) before the x-ray crystal structure was solved (33). Moreover, interpretation of the heme methyl resonances from PigA in the context of the plot of Fig. 8 also made it possible to predict (9) that the heme in this enzyme is rotated in-plane  $\sim 110^\circ$  relative to the heme in  $\alpha$ -biliverdin HO enzymes before the x-ray crystal structure of PigA (34) confirmed this prediction. Hence, the order of the heme methyl resonances,  $3\text{Me} > 8\text{Me} > 5\text{Me} > 1\text{Me}$  (see Table II) suggests that the proximal histidine-imidazole plane in BphO forms an angle of  $\sim 133^\circ$  with respect to the molecular  $x$ -axis, as defined in Fig. 8. This indicates that the proximal histidine-imidazole plane in BphO lies almost parallel to the  $\beta$ - $\delta$ -meso axis (shown schematically in Fig. 8) as is the case for all  $\alpha$ -biliverdin producing HOs whose structure is known (human (33) and rat (35) HO-1, HemO (36), and HmuO (37)).

**Interaction between HO·BV Complexes and BphP**—It has been mentioned above that recombinant BphO purifies as a stable BphO-BV complex. The bound BV cannot be removed by gel filtration, ion exchange chromatography, or changes in solution pH, indicating that the release of the BV product is probably the rate-limiting step in this reaction and that BV has



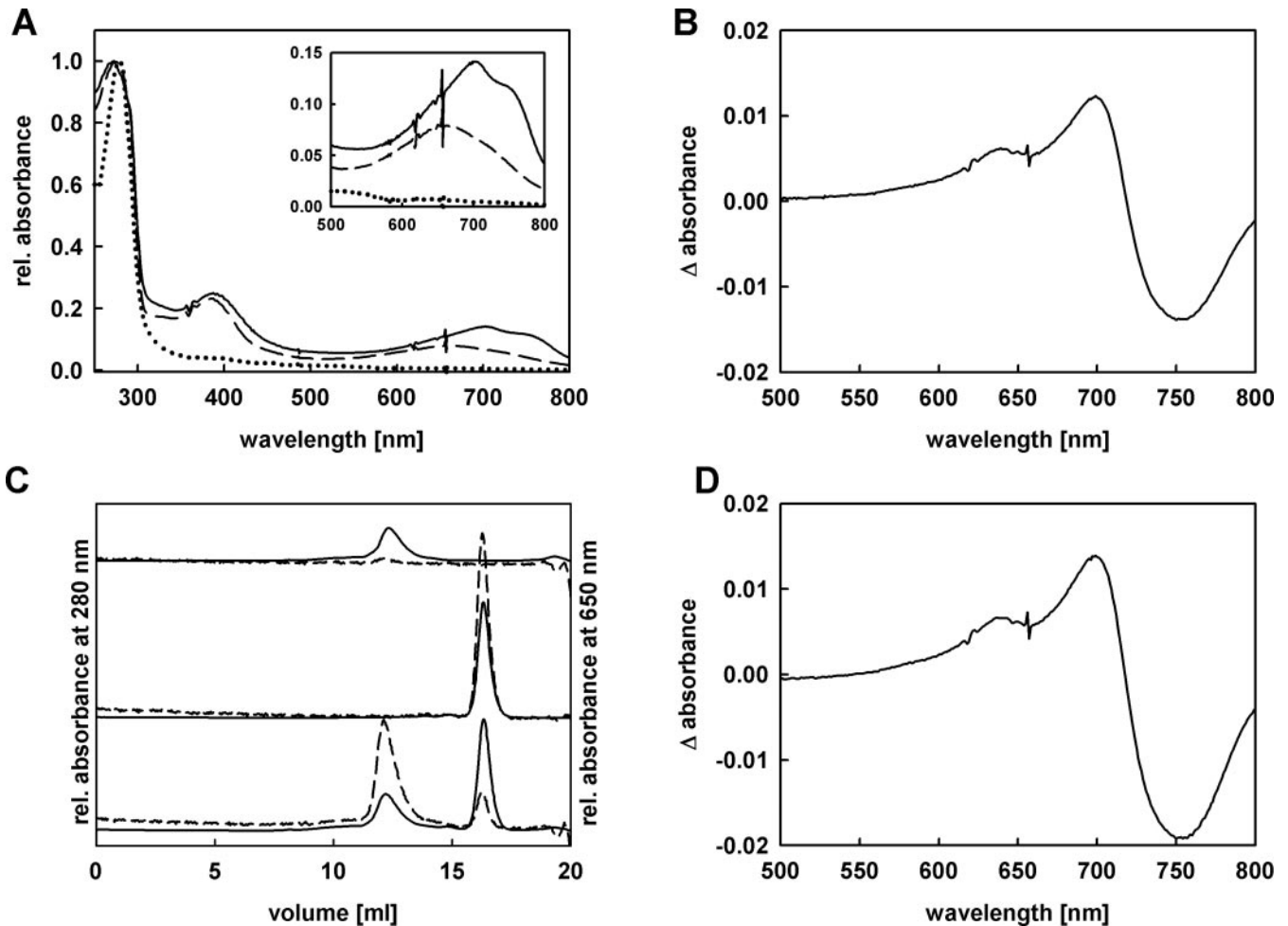


FIG. 9. **Characterization of the interaction between HO-BV complexes with BphP.** A, absorbance spectra of purified BphO-BV (dashed line), apo-BphP (dotted line), and a 1:1 mixture of both (solid line). The inset shows an enlargement of the region between 500 and 800 nm. B, red- and far-red light-induced difference spectroscopy of the 1:1 mixture of BphO-BV and apo-BphP. C, gel permeation chromatography of BphO and BphP using a Superdex 200 column. Absorbance values were monitored at 280 nm (protein; solid lines) and 650 nm (BV; dashed lines). Upper chromatogram, BphP; second chromatogram, BphO-BV; lower chromatogram, 1:1 mixture of BphP and BphO-BV. D, red- and far-red light-induced difference spectroscopy of the 1:1 mixture of PigA-BV and apo-BphP.

a high affinity toward BphO. The release of BV is known to be the rate-limiting step in other HOs. In the case of mammalian HOs the rate limitation is overcome by the presence of BVR, the subsequent enzyme in heme catabolism; the presence of BVR accelerates the release of BV (38). Because *P. aeruginosa* lacks a BVR homologue, another enzyme might be involved in the release of BV from BphO. Because the *bphO* gene is located in an operon together with the gene *bphP*, which encodes a bacterial phytochrome, we tested the interaction between recombinant BphO and BphP (a) to probe if BphO is able to produce the chromophore for BphP and (b) to investigate if the release of BV is facilitated through the interaction with BphP. Hence, purified BphO-BV was incubated with purified apo-BphP while monitoring changes in absorbance. The mixture was subsequently subjected to red- and far-red light-induced difference spectroscopy (39) to test for the formation of *holo*-BphP. As shown in Fig. 9A the spectrum of BphO-BV changes upon addition of BphP leading to the formation of a photoactive *holo*-BphP (Fig. 9B). To further confirm that BphO and BphP interact to transfer the BV produced by BphO to BphP, we subjected both proteins to gel permeation chromatography (GPC) to see whether we obtain any physical interaction between both proteins. As seen in Fig. 9C both proteins by themselves elute as single peaks on a Superdex 200 GPC column (upper two elution profiles). Monitoring the absorbance values at both 280 nm (protein) and 650 nm (BV) confirmed that BphO

forms a very stable complex with BV. After incubation of both proteins in a 1:1 ratio and subsequent chromatography, we were still able to separate both proteins from each other. However, a major portion of the absorbance at 650 nm (*i.e.* BV) was then associated with BphP, indicating that BV was removed from BphO and was attached to BphP. This attachment was identified to be covalent by zinc blotting (40) (data not shown) and is in agreement with other known bacterial phytochromes that form a covalent complex with BV (11, 41). Experiments to identify real physical interaction between BphO and BphP using the GPC method after Hummel and Dreyer (42) with BphO-BV in the mobile phase did not reveal a stable complex of both proteins (data not shown).

Because PigA, the second HO in *P. aeruginosa*, also purifies as a stable PigA-BV complex, similar experiments were performed using the PigA-BV complex. Incubation of PigA-BV with BphP also resulted in an absorbance change yielding a functional *holo*-BphP (Fig. 9D). In contrast to BphO, which only produced the  $\alpha$ -isomer of BV IX, PigA produced two different isomers of BV IX. Because the purified PigA-BV complex most likely consisted of a mixture of PigA-BV IX $\beta$  and PigA-BV IX $\delta$ , it was necessary to establish which BV isomer is responsible for the obtained photoactive phytochrome. Therefore, we obtained each BV isomer through coupled oxidation of heme and tested whether they are able to bind to apo-BphP. As shown in Fig. 10 only the BV isomers IX $\alpha$  and IX $\delta$  are able to form a photoactive

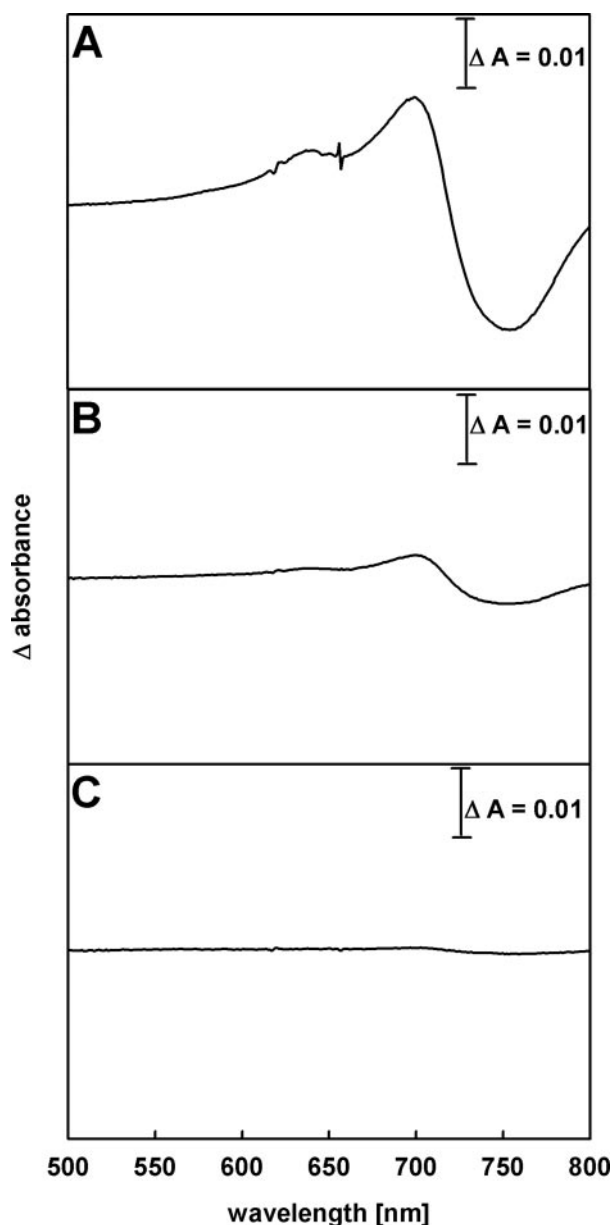


FIG. 10. Difference spectroscopy of BphP incubated with the BV IX isomers produced by *P. aeruginosa*. A, BphP incubated with BV IX $\alpha$ ; B, BphP incubated with BV IX $\delta$ ; C, BphP incubated with BV IX $\beta$ .

holo-phytochrome. The  $\Delta\Delta A$  of the obtained difference spectrum with BV IX $\delta$  is  $\sim$ one-fifth of that with BV IX $\alpha$  implying a lower affinity of BV IX $\delta$  toward BphP. Furthermore, it was shown that both isomers ( $\alpha$  and  $\delta$ ) form a covalent bond with BphP (data not shown). These results indicate that the obtained difference spectrum after incubation of PigA-BV with BphP is due to the covalent attachment of BV IX $\delta$  to BphP.

#### DISCUSSION

*bphO* Encodes a Second Heme Oxygenase in *P. aeruginosa*—The Gram-negative opportunistic pathogen *P. aeruginosa* is the first example of an organism that harbors two heme oxygenases with different regiospecificity of heme cleavage. The PigA enzyme has already been well characterized and is known to be involved in the mining of heme-iron under the free-iron limiting conditions likely to occur during infection of a host cell (7). On the basis of  $^1\text{H}$  NMR and resonance Raman studies, it was recently determined that the unusual regiospecificity of PigA is due to a rotated seating of the heme substrate in the

active site pocket (9). This observation was further confirmed by the recently published crystal structure of PigA (34). The biological reason for the production of BV IX $\beta$  and BV IX $\delta$ , however, remains unknown. In comparison, to date, there is only indirect evidence that *bphO* genes encode for functional HOs (11). In this report we present biochemical and biophysical evidence demonstrating that recombinant *P. aeruginosa* BphO is indeed a heme oxygenase that catalyzes the conversion of heme to BV IX $\alpha$ .

*BphO Prefers Ferredoxins and Ascorbate as Reducing Partners*—Most HOs are capable of utilizing an endogenous *E. coli* electron donor, which is manifested as a green color in *E. coli* cells expressing HOs (3, 27, 43). *In vitro*, however, the activity of most bacterial HOs is usually tested using either mammalian CPR or ascorbate as an electron donor. *E. coli* possesses several reductants that could possibly serve as electron donors; among them are several Fds and flavodoxin (44). We therefore tested commercially available Fds, as well as ascorbate, for their ability to serve as electron donors for the *P. aeruginosa* HOs. Indeed, we were able to show that reduced Fds can serve as the electron donor in the BphO reaction, yielding ferric-BV as the final product. In the presence of catalase the conversion from heme to ferric-BV was arrested at the stage of the oxyferrous complex, suggesting that the conversion of the oxyferrous complex to ferric-BV is partly due to coupled oxidation. Fd has a sufficiently negative reduction potential to reduce  $\text{O}_2$  to superoxide (45); hydrogen peroxide is then spontaneously formed through dismutation of the superoxide radical. The presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which is known to react with  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -heme to hydroxylate the heme (46), is scavenged by the presence of catalase. Only when a second reductant such as ascorbate is added to the reaction mixture, is the oxyferrous complex oxidized to BV, thus indicating that the reaction is catalyzed by BphO. The requirement for a second reductant in addition to Fd is in agreement with observations described for HO from algae, plants, and cyanobacteria (28, 47). Interestingly, it has been shown that the cyanobacterial HO-1 reaction is also terminated at the oxyferrous complex stage with cytochrome P450 reductase (27) indicating that this is a stable intermediate and that the following steps in the catalytic cycle might require a second reductant. Alternatively, it is also possible that the true physiological reductant in *P. aeruginosa* is capable of supporting the complete catalytic cycle. In contrast to other described bacterial HOs, hCPR was unable to mediate the conversion of heme to BV by BphO in our assay system, indicating that with regard to the redox partner BphO is quite different from other bacterial HOs and more similar to those described for cyanobacteria and plants. In agreement with many other described HOs, ascorbate is also capable of serving as an electron donor in the BphO reaction. Because catalase has no effect in the ascorbate-supported reaction, no coupled oxidation is involved during catalysis. Therefore it appears that ascorbate is the most efficient reductant tested for the *in vitro* activity of BphO. The origins of the endogenous reductant in *E. coli* and the one supporting the activity in *P. aeruginosa* remain to be elucidated.

*The Second HO in P. aeruginosa, BphO, is an  $\alpha$ -Meso-hydroxylating Enzyme*—PigA was initially reported to oxidize heme to produce mostly  $\beta$ -biliverdin (7). Subsequent studies established that PigA oxidizes heme to a mixture of  $\beta$ - (30%) and  $\delta$ - (70%) biliverdin (9). Further, NMR spectroscopic studies revealed that the heme in PigA is rotated in-plane  $\sim 100^\circ$  relative to the heme in all  $\alpha$ -hydroxylating heme oxygenase enzymes (9) (see Fig. 11A). This in-plane rotation locates the  $\delta$ -meso carbon within the fold of PigA in the same place where  $\alpha$ -biliverdin forming HOs place the  $\alpha$ -meso carbon (9) (see Fig. 11B). Hence, attack of the  $\delta$ -meso carbon in PigA leads to the

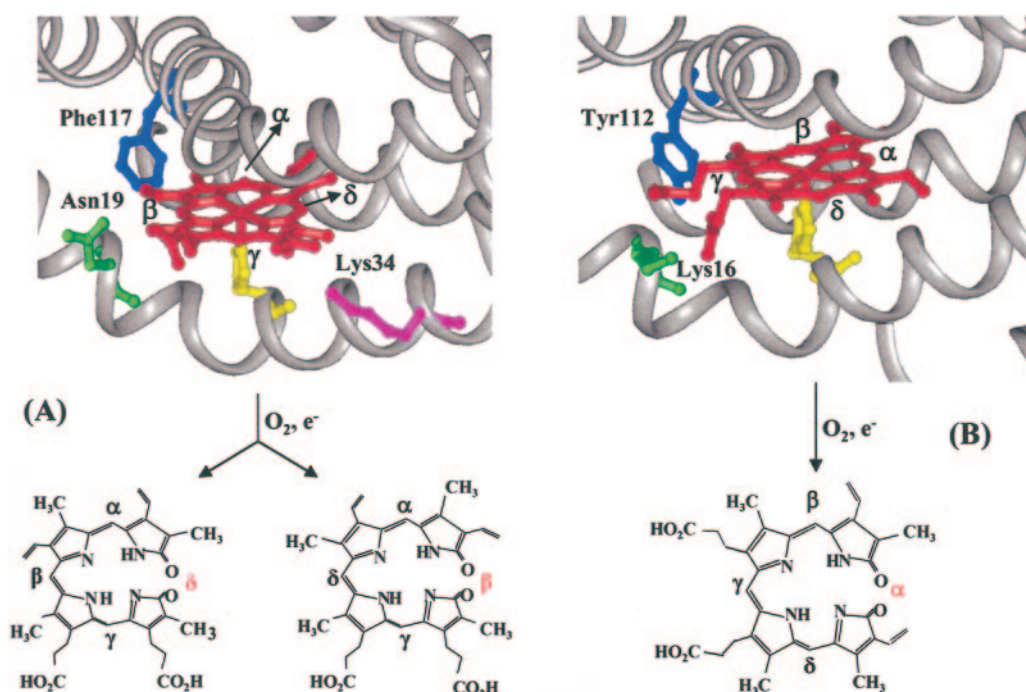


FIG. 11. A, the in-plane heme orientation in PigA places the  $\delta$ -meso carbon within the fold where it is susceptible to oxidation. A  $180^\circ$  rotation of the heme about the  $\alpha$ - $\gamma$ -meso carbon places the  $\beta$ -meso carbon where it is susceptible to oxidation (9, 34). B, the heme in  $\alpha$ -biliverdin producing HOs (HemO is used as an example (36)) places the  $\alpha$ -meso carbon in a location equivalent to that of the  $\delta$ -meso carbon in PigA, thus resulting in  $\alpha$ -meso carbon oxidation.

formation of 70%  $\delta$ -biliverdin. Inspection of Fig. 11A also reveals that a  $180^\circ$  rotation of the heme about the  $\alpha$ - $\gamma$ -meso axis, a phenomenon common in heme proteins where the heme is not covalently attached to the polypeptide (48), places the  $\beta$ -meso carbon where it is attacked, thus explaining the formation of 30%  $\beta$ -biliverdin (9). More recently it has been shown that the heme, in one of the heme orientational isomers of the R177E mutant of *C. diphtheriae* HmuO, rotates  $\sim 85^\circ$  and places the  $\beta$ -meso carbon in the place typically occupied by the  $\alpha$ -meso carbon, which results in the formation of  $\sim 50\%$   $\beta$ -biliverdin (21). Results obtained from the NMR spectroscopic analysis of BphO strongly suggest that the fold of BphO is likely very similar to that of the other heme oxygenase enzymes. Moreover, these observations also imply that one of the most important structural differences between the two heme oxygenase enzymes in *P. aeruginosa* is the in-plane conformation of the heme, with the heme in PigA being rotated  $\sim 110^\circ$  relative to that of the heme in BphO. This different in-plane conformation of the heme allows BphO to locate the  $\alpha$ -meso carbon where it can be hydroxylated by the  $Fe^{III}$ -OOH intermediate.

**Interaction between BphO and BphP Facilitates the Release of BV from BphO**—Single turnover experiments of human HO-1 have revealed that the release of BV from HO-1 is the rate-limiting step in the conversion from heme to BV (38). In the presence of BVR, this step is accelerated and one of the earlier electron transfer steps becomes rate-limiting. The data presented here indicate that the bacterial phytochrome BphP from *P. aeruginosa* whose gene is encoded in the same operon as *bphO* is able to interact with the BphO-BV complex and facilitates the release of BV. The BV is “pulled” out of the HO and forms a stable covalent adduct with BphP, which was confirmed by difference spectroscopy and zinc blotting. BphP is not only able to use iron-free BV as a substrate (as shown with purified BphO-BV complex) but also the  $Fe^{3+}$ -BV, which is the product of the Fd-mediated reaction (data not shown). These results indicate that BphO produces the chromophore for the bacterial phytochrome BphP and that the activity of BphO

might be regulated through the interaction between BphO and BphP. The biological role of BphP still remains to be elucidated.

In addition to the BphO-BphP interaction, we were able to show that BphP also facilitates the release of BV from PigA. From reports by other groups it is known that an A-ring endo vinyl-group of the BV is necessary for binding to BphP (41). Therefore, only the BV IX $\delta$  isomer should yield a photoactive *holo*-BphP. Indeed, using the BV isomers obtained from a coupled oxidation reaction, we were able to show that only BV IX $\delta$  binds to BphP. The attachment was shown to be covalent. This indicates that the release of the bound BV from the HO is determined by the type of bound BV rather than by the nature of the protein. Therefore, the *holo*-BphP obtained upon incubation of PigA-BV with BphP arises from the release of BV IX $\delta$  from PigA. Because PigA *in vitro* produces the BV isomers in a ratio of 30:70 (IX $\beta$ :IX $\delta$ ) (9), BV IX $\delta$  is a possible chromophore for BphP, although the amount of resultant *holo*-BphP is only one-fifth that of the BV IX $\alpha$ -BphP adduct. This could be due to a lower affinity of BV IX $\delta$  toward BphP. Therefore, the function of this photoactive phytochrome might be different from that with bound BV IX $\alpha$ . Although we were able to show in this study that BphP is able to bind BV IX $\delta$ , its physiological significance remains to be proven, because PigA is only expressed under iron-limiting conditions, and it is presently unknown if BphP is expressed under these conditions as well. The role of the interaction with BphP in controlling enzymatic activity of the two HOs and the physiological consequences of the formed *holo*-BphP are subjects of continuing efforts in our laboratories.

**Acknowledgments**—The cloning and initial experiments of this project were started in the laboratory of J. Clark Lagarias (University of California at Davis). His encouragement and continuous support as well as the gift of a rat BVR expression clone is greatly acknowledged. We thank Paul Ortiz de Montellano for the gift of an hCPR expression clone. Thanks are also due to Angela Wilks for helpful discussions.

#### REFERENCES

1. Maines, D. M. (1988) *FASEB J.* **2**, 2557–2568
2. Wilks, A. (2002) *Antiox. Redox Signal.* **4**, 603–614



3. Wilks, A., and Schmitt, M. P. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 837–841
4. Skaar, E. P., Gaspar, A. H., and Schneewind, O. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 436–443
5. Zhu, W., Hunt, D. J., Richardson, A. R., and Stojiljkovic, I. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 439–447
6. Schmitt, M. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 838–845
7. Ratliff, M., Zhu, W., Deshmukh, R., Wilks, A., and Stojiljkovic, I. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 6394–6403
8. Vasil, M. L., and Ochsner, U. A. (1999) *Mol. Microbiol.* **34**, 399–413
9. Caignan, G. A., Deshmukh, R., Wilks, A., Zeng, Y., Huang, H. W., Moenne-Loccoz, P., Bunce, R. A., Eastman, M. A., and Rivera, M. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14879–14892
10. Davis, S. J., Vener, A. V., and Vierstra, R. D. (1999) *Science* **286**, 2517–2520
11. Bhoo, S.-H., Davis, S. J., Walker, J., Karniol, B., and Vierstra, R. D. (2001) *Nature* **414**, 776–779
12. Frankenberg, N., Mukougawa, K., Kohchi, T., and Lagarias, J. C. (2001) *Plant Cell* **13**, 965–978
13. Skerra, A. (1994) *Gene (Amst.)* **151**, 131–135
14. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
15. Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319–326
16. Muramoto, T., Kohchi, T., Yokota, A., Hwang, I., and Goodman, H. M. (1999) *Plant Cell* **11**, 335–348
17. Yoshida, T., and Kikuchi, G. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 4224–4229
18. Berry, E. A., and Trumpower, B. L. (1987) *Anal. Biochem.* **161**, 1–15
19. Bunce, R. A., Shilling, C. L., III, and Rivera, M. (1997) *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **39**, 669–675
20. Rivera, M., and Walker, F. A. (1995) *Anal. Biochem.* **230**, 295–302
21. Zeng, Y., Deshmukh, R., Caignan, G. A., Bunce, R. A., Rivera, M., and Wilks, A. (2004) *Biochemistry* **43**, 5222–5238
22. Rivera, M., and Caignan, G. A. (2004) *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 1464–1483
23. Warren, M. J., and Scott, A. I. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 426
24. Patt, S. L., and Sykes, B. D. (1972) *J. Chem. Phys.* **56**, 3182–3184
25. Lankhorst, P. P., Wille, G., van Boom, J. H., Altona, C., and Haasnoot, C. A. G. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 2839–2856
26. Bonnett, R., and McDonagh, A. F. (1973) *J. Chem. Soc.* **9**, 881–888
27. Migita, C. T., Zhang, X., and Yoshida, T. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 687–698
28. Cornejo, J., Willows, R. D., and Beale, S. I. (1998) *Plant J.* **15**, 99–107
29. Li, Y., Syvitski, R. T., Auclair, K., Wilks, A., Ortiz de Montellano, P. R., and La Mar, G. N. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 33018–33031
30. Hernandez, G., Wilks, A., Paolesse, R., Smith, K. M., Ortiz de Montellano, P. R., and La Mar, G. N. (1994) *Biochemistry* **33**, 6631–6641
31. Gorst, C. M., Wilks, A., Yeh, D. C., Ortiz de Montellano, P. R., and La Mar, G. N. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 8875–8884
32. Shokhirev, N. V., and Walker, F. A. (1998) *J. Biol. Inorg. Chem.* **3**, 581–594
33. Schuller, D. J., Wilks, A., Ortiz de Montellano, P. R., and Poulos, T. L. (1999) *Nat. Struct. Biol.* **6**, 860–867
34. Friedman, J., Lad, L., Li, H., Wilks, A., and Poulos, T. L. (2004) *Biochemistry* **43**, 5239–5245
35. Sugishima, M., Omata, Y., Kakuta, Y., Sakamoto, H., Noguchi, M., and Fukuyama, K. (2000) *FEBS Lett.* **471**, 61–66
36. Schuller, D. J., Zhu, W. M., Stojiljkovic, I., Wilks, A., and Poulos, T. L. (2001) *Biochemistry* **40**, 11552–11558
37. Hirotsu, S., Chu, G. C., Unno, M., Lee, D.-S., Yoshida, T., Park, S.-Y., Shiro, Y., and Ikeda-Saito, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 11937–11947
38. Liu, Y., and Ortiz de Montellano, P. R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5297–5307
39. Terry, M. J., and Lagarias, J. C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22215–22221
40. Berkelman, T. R., and Lagarias, J. C. (1986) *Anal. Biochem.* **156**, 194–201
41. Lamparter, T., Michael, N., Caspani, O., Miyata, T., Shirai, K., and Inomata, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 33786–33792
42. Hummel, J. P., and Dreyer, W. J. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 530–532
43. Zhang, X., Sato, M., Sasahara, M., Migita, C. T., and Yoshida, T. (2004) *Eur. J. Biochem.*
44. Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) *Science* **277**, 1453–1474
45. Arora, A., Sairam, R. K., and Srivastava, G. C. (2002) *Curr. Sci.* **82**, 1227–1238
46. Avila, L., Huang, H. W., Damaso, C. O., Lu, S., Moenne-Loccoz, P., and Rivera, M. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4103–4110
47. Muramoto, T., Tsurui, N., Terry, M. J., Yokota, A., and Kohchi, T. (2002) *Plant Physiol.* **130**, 1958–1966
48. La Mar, G., N., Burns, P. D., Jackson, J. T., Smith, K. M., Langry, K. C., and Strittmatter, P. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 6075–6079
49. Bertini, I., Luchinat, C., Parigi, G., and Walker, F. A. (1999) *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**, 515–519

Anhang 2

Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of  
*Pseudomonas aeruginosa*

(Tasler *et al.* (2005) *FEBS J.* 272,1927-1936.)

# Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*

Ronja Tasler, Tina Moises and Nicole Frankenberg-Dinkel

Institute for Microbiology, Technical University Braunschweig, Germany

## Keywords

biliverdin; histidine kinase; linear tetrapyrrole; photoreceptor; two-component system

## Correspondence

N. Frankenberg-Dinkel, Institute for Microbiology, Technical University Braunschweig, Spielmannstr. 7, 38106 Braunschweig, Germany  
Fax: +49 531 391 5854  
Tel: +49 531 391 5815  
E-mail: n.frankenberg@tu-bs.de

(Received 2 February 2005, revised 17 February 2005, accepted 21 February 2005)

doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04623.x

Phytochromes are photochromic biliproteins found in plants as well as in some cyanotrophic, photoautotrophic and heterotrophic bacteria. In many bacteria, their function is largely unknown. Here we describe the biochemical and spectroscopic characterization of recombinant bacterial phytochrome from the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (*PaBphP*). The recombinant protein displays all the characteristic features of a bonafide phytochrome. In contrast with cyanobacteria and plants, the chromophore of this bacterial phytochrome is biliverdin IX $\alpha$ , which is produced by the heme oxygenase BphO in *P. aeruginosa*. This chromophore was shown to be covalently attached via its A-ring endo-vinyl group to a cysteine residue outside the defined bilin lyase domain of plant and cyanobacterial phytochromes. Site-directed mutagenesis identified Cys12 and His247 as being important for chromophore binding and photoreversibility, respectively. *PaBphP* is synthesized in the dark in the red-light-absorbing Pr form and immediately converted into a far-red-light-absorbing Pfr-enriched form. It shows the characteristic red/far-red-light-induced photoreversibility of phytochromes. A chromophore analog that lacks the C15/16 double bond was used to show that this photoreversibility is due to a 15Z/15E isomerization of the biliverdin chromophore. Autophosphorylation of *PaBphP* was demonstrated, confirming its role as a sensor kinase of a bacterial two-component signaling system.

Phytochromes are biliprotein photoreceptors in plants but have recently also been discovered in bacteria [1]. In plants, the family of phytochromes sense red and far-red light and therefore play a key role in mediating responses to light quality, quantity, direction and duration throughout plant development [2]. Plant phytochromes are homodimers composed of  $\approx$ 125-kDa subunits each with a thioether-linked phytochromobilin prosthetic group [3]. Unlike the light-harvesting cyanobacterial phycobiliproteins which require a lyase for the covalent attachment of the linear tetrapyrrole (bilin) chromophore, bilin attachment to apo-phytochromes is autocatalytic [4]. The action of phyto-

chrome depends on its ability to photointerconvert between the red-light-absorbing Pr form and the far-red-light-absorbing Pfr form, a property conferred by the covalently bound phytochromobilin in the plant holophytochrome. The first phytochrome from a bacterial source to be discovered was Cph1 (cyanobacterial phytochrome 1) from *Synechocystis* sp. PCC6803 which was followed by the discovery of bacterial phytochromes (BphPs) from nonphotosynthetic bacteria [1,5,6]. BphPs are typical sensor kinases of a two-component signaling system. Most BphPs including that of *Pseudomonas aeruginosa* (*PaBphP*) carry a C-terminal histidine kinase module, and it has been shown that

## Abbreviations

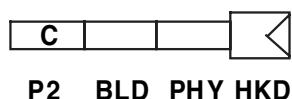
BLD, bilin lyase domain; BVR, biliverdin reductase; *PaBphP*, *Pseudomonas aeruginosa* bacterial phytochrome; PAS, PER/ARNT/SIM repeats.

many of them, such as *Synechocystis* Cph1 [6], *Agrobacterium* Agp1 and Agp2 [7,8] and also *Pseudomonas syringae* BphP [9], are light-regulated histidine kinases.

Unlike plant and cyanobacterial phytochromes, which carry a phytochromobilin or phycocyanobilin chromophore, BphPs have been shown to utilize a biliverdin chromophore [9]. Apart from Cph1, most members of the BphP family lack the conserved cysteine residue in the conserved bilin lyase domain (BLD). This domain has been defined as the minimal GAF domain, capable of autocatalytic assembly with bilin chromophores [10]. GAF domains are small ligand-binding domains found in vertebrate cGMP-specific phosphodiesterases, cyanobacterial adenylate cyclases and the formate hydrogen lyase transcription activator FhlA [11]. In most phytochromes, the BLD is preceded by the P2 domain, which is often recognized as a PAS domain in the Pfam database (protein families database; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) [12]. PAS domains are tandem repeats first described in the transcriptional regulatory proteins period clock (PER) from *Drosophila melanogaster*, the murine aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) and single minded (SIM) from *D. melanogaster* [13]. Interestingly, a cysteine residue in this P2 domain has been shown to be the site of chromophore attachment in Agp1 from *Agrobacterium tumefaciens* [7,14]. Another characteristic domain in phytochromes is the PHY domain which corresponds to a GAF-related domain located C-terminally to the BLD (Scheme 1).

Recently we have shown that BphP from *P. aeruginosa* is able to bind biliverdin IX $\alpha$  and biliverdin IX $\delta$ , which are produced by the two heme oxygenases BphO and PigA [15]. As *bphO* is chromosomally located upstream of *bphP* and the affinity for biliverdin IX $\alpha$  was about fivefold higher than for biliverdin IX $\delta$ , we concluded that biliverdin IX $\alpha$  is the natural chromophore of PaBphP. Furthermore, we presented data indicating an involvement of BphP in biliverdin release from BphO, as this is the rate-limiting step of the BphO reaction.

Here we describe the further biochemical and spectroscopic characterization of BphP.



**Scheme 1.** Domain structure of the *P. aeruginosa* phytochrome. P2, PAS domain; BLD, bilin lyase domain (a GAF domain); PHY, phytochrome domain (GAF-related domain); HKD, histidine kinase domain.

## Results

### Expression, purification and initial characterization of recombinant *P. aeruginosa* phytochrome

The *P. aeruginosa bphP* was expressed using a *tet* promoter-driven C-terminal Strep tag expression system. Recombinant BphP was always purified in the apo form, and the homogeneity after purification was  $\approx 98\%$  (Fig. 1, inset). A single band migrating at  $\approx 80$  kDa was obtained on SDS/PAGE, which correlates with the predicted molecular mass calculated from the amino-acid composition (80.1 kDa). The yield of purified BphP was typically 5 mg per litre of bacterial culture. Analytical gel permeation chromatography revealed that the apo form, as well as the assembled holo form, of BphP is eluted as a dimer from a Superdex 200 column (data not shown; [15]).

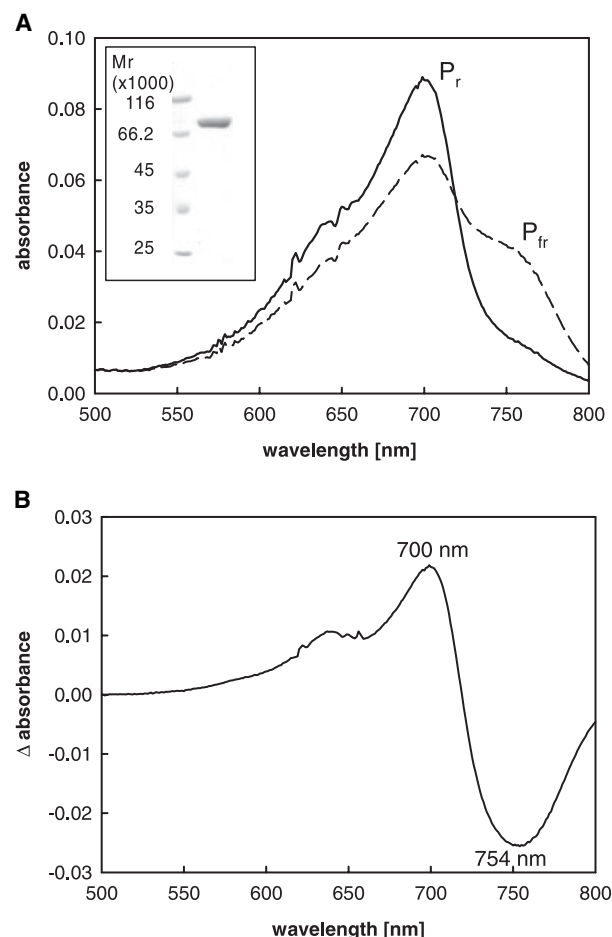
### Assembly and chromophore binding

PaBphP is able to autocatalytically form a photoconvertible holo-phytochrome with the proposed natural chromophore biliverdin IX $\alpha$ . Illumination of recombinant holo-BphP with saturating red light (630 nm) resulted in the formation of the Pfr form (Pfr-enriched) which could be converted back into the Pr form through illumination with far-red light (750 nm) (Fig. 1A). The resultant calculated difference spectrum shows the characteristic phytochrome signature (Fig. 1B) with maxima of 700 and 754 nm for the Pr and Pfr form, respectively. These far-red absorbance maxima seem to be typical of biliverdin-binding phytochromes and represent the most red-shifted phytochrome forms described so far [7,16]. The covalent binding of biliverdin IX $\alpha$  was confirmed by zinc-induced red fluorescence (Fig. 3C).

The form initially synthesized after the addition of biliverdin IX $\alpha$  to apo-BphP in the dark is the Pr form, which is immediately converted nonphotochemically into a Pfr-enriched form. This nonphotochemical conversion reaches an equilibrium between Pr and Pfr forms after 90 min (Fig. 2A). Irradiation with far-red light leads to the formation of the Pr form with one peak at 700 nm, which can be converted back into the Pfr form by irradiation with red light. Both the Pr and the Pfr form are unstable in the dark and convert back into a dark form, a Pfr-enriched mixture of Pr and Pfr (Fig. 2B,C).

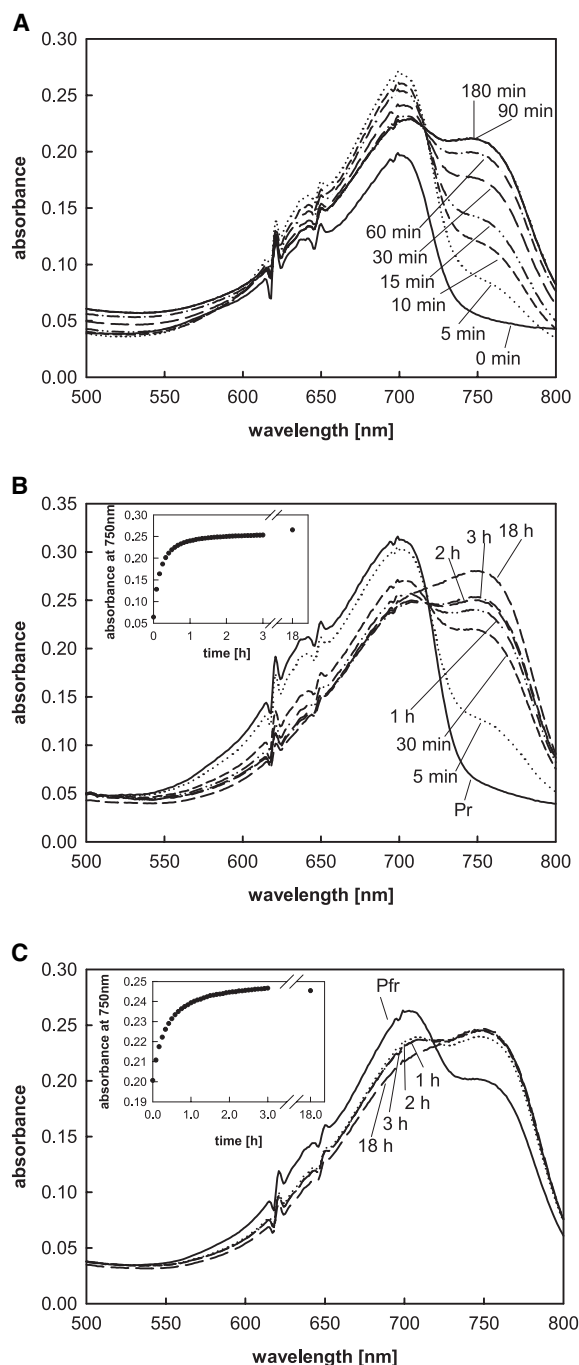
### Chromophore-protein interaction

To determine which part of the bilin chromophore is involved in covalent attachment to the protein, various



**Fig. 1.** (A) Absorbance spectra of recombinant BphP incubated with biliverdin IX $\alpha$ . Pfr, Pfr-enriched form obtained after illumination with red light (630 nm) (dashed line); Pr, Pr form obtained after illumination with far-red light (750 nm) (solid line). The inset shows the SDS/PAGE analysis of BphP after affinity chromatography. (B) Calculated Pr–Pfr difference spectrum.

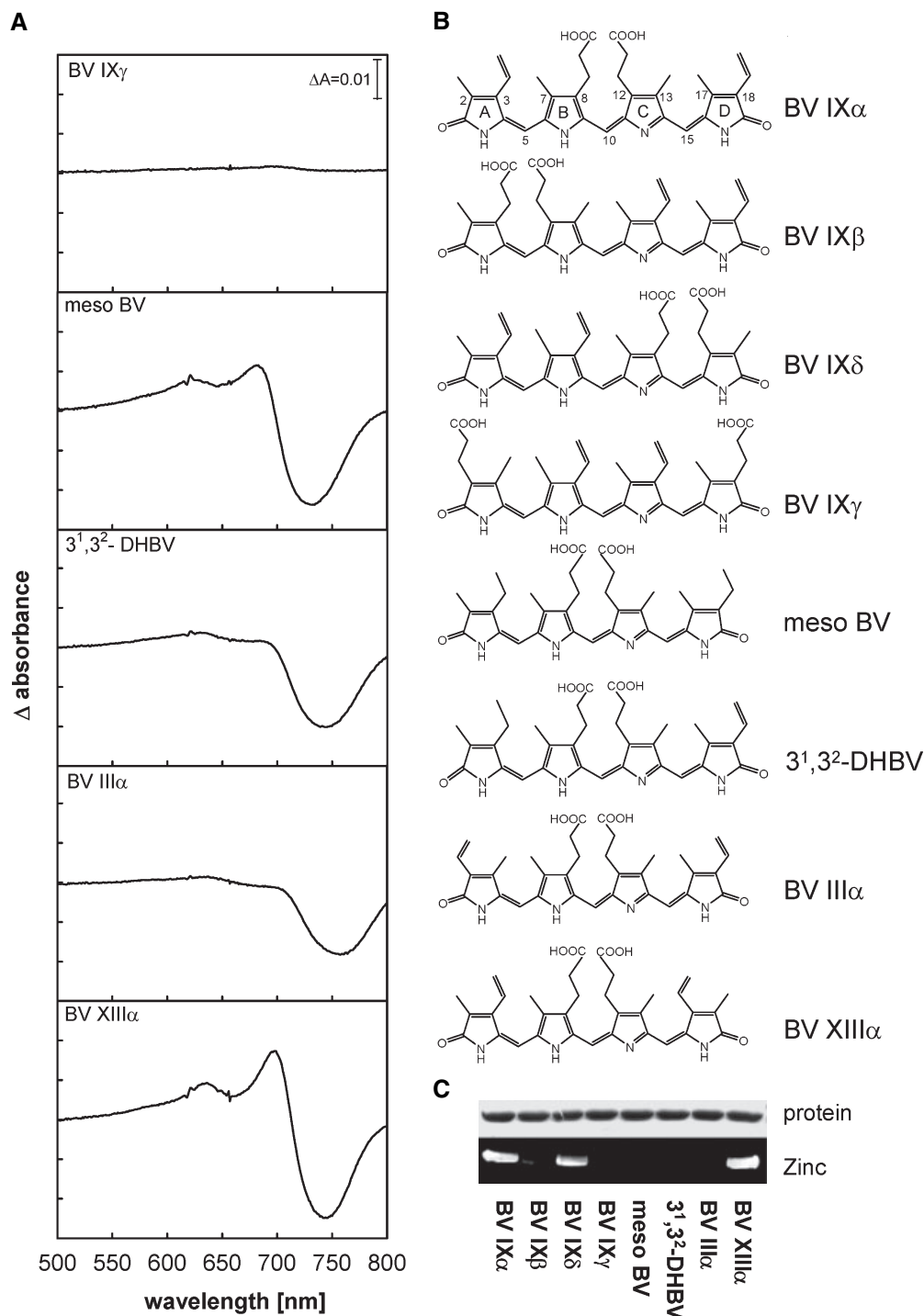
biliverdin derivatives were used (see Fig. 3B for chemical structures). The resultant chromoproteins were characterized by red/far-red-light-induced difference spectroscopy (Fig. 3A). The spectral properties are summarized in Table 1. BphP is able to covalently bind biliverdin IX $\delta$  and biliverdin XIII $\alpha$ , which was confirmed by zinc-induced red fluorescence (Fig. 3C). Furthermore, these biliverdin adducts were able to form a photoconvertible holophytochrome. No characteristic difference spectrum nor covalent binding was observed with biliverdin IX $\beta$ , biliverdin IX $\gamma$ , mesobiliverdin, 3<sup>1</sup>,3<sup>2</sup>-dihydrobiliverdin and biliverdin III $\alpha$  (Fig. 3B,C and [15]). The common feature of all covalently bound biliverdin derivatives is an A-ring endo-vinyl group, indicating that this side chain is absolutely required for



**Fig. 2.** Spectral properties of holo-BphP. (A) Absorbance spectrum changes during 3 h in the dark after assembly of apo-BphP with biliverdin. (B) Dark reversion of BphP photoconverted in the Pr form. (C) Dark reversion of BphP photoconverted in the Pfr form. Inserts in (B) and (C) show the time-dependent absorbance changes at 750 nm.

covalent attachment. Furthermore, these results imply that the ring substituents of the other pyrrole rings do not seem to be critical for photoconversion.





**Fig. 3.** (A) Difference spectroscopy of BphP incubated with biliverdin isomers. From top to bottom: BphP incubated with biliverdin IX $\gamma$ , mesobiliverdin, 3<sup>1</sup>,3<sup>2</sup>-dihydrobiliverdin, biliverdin III $\alpha$  and biliverdin XIII $\alpha$ . For difference spectrum of BphP–biliverdin IX $\alpha$ , see Fig. 1B; BphP–biliverdin IX $\beta$ / $\delta$  [15]. (B) Chemical structures of the biliverdin isomers. (C) Zinc-induced red fluorescence of BphP with different chromophores. Apo-BphP was incubated with different biliverdin isomers; after SDS/PAGE analysis (labeled protein) and electroblotting, covalently bound bilins were visualized using zinc-induced red fluorescence (labeled zinc).

### Photoisomerization of *Pa*BphP

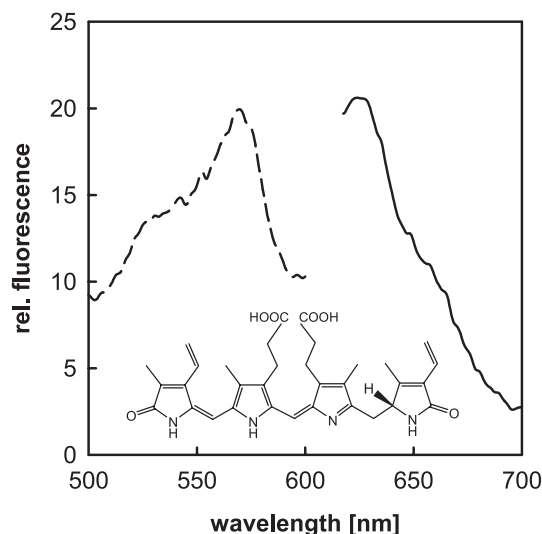
The primary photoreaction of plant phytochromes is known to be the 15*Z*/15*E* isomerization of the phytochromobilin chromophore [17]. If the C15 double bond is missing (i.e. in phycoerythrobilin), the corresponding phytochrome adduct is unable to undergo photoisomerization but instead is highly fluorescent [18]. This fluorescent adduct of phytochromes is also known as a phytofluor [19]. To elucidate whether the photoisomerization in *Pa*BphP is also due to a 15*Z*/15*E* isomerization of the bilin prosthetic group (in this case biliverdin), we incubated apo-BphP with 15,16-dihydrobiliverdin (see Fig. 4 for structure). 15,16-Dihydrobiliverdin can be synthesized *in vitro* from biliverdin by the ferredoxin-dependent bilin reductase PebA [20]. Apo-BphP is able to bind 15,16-dihydrobiliverdin and is orange fluorescent under UV light (312 nm). This phenomenon was investigated fluorospectrometrically. Excitation at 570 nm resulted in a fluorescent phytofluor with an emission maximum of 630 nm (Fig. 4).

### Chromophore attachment site

BphP lacks the conserved cysteine residue involved in covalent bilin attachment in plant and most cyanobacterial phytochromes, and therefore the site and kind of attachment of the bilin chromophore in the bacterial phytochromes is controversial [1,21,22]. To investigate whether the chromophore is attached via a thioether linkage to a cysteine residue, the protein was treated with iodoacetamide. This reagent specifically modifies cysteine residues. If a chromophore-binding cysteine is accessible to iodoacetamide, a subsequent covalent chromophore attachment should be inhibited. Addition of increasing amounts of iodoacetamide leads to a reduction in photoisomerization, as visualized by difference spectroscopy and covalent chromophore binding (i.e. decreased zinc-induced red fluorescence). Full inhibition was observed with 1 mM iodoacetamide (data

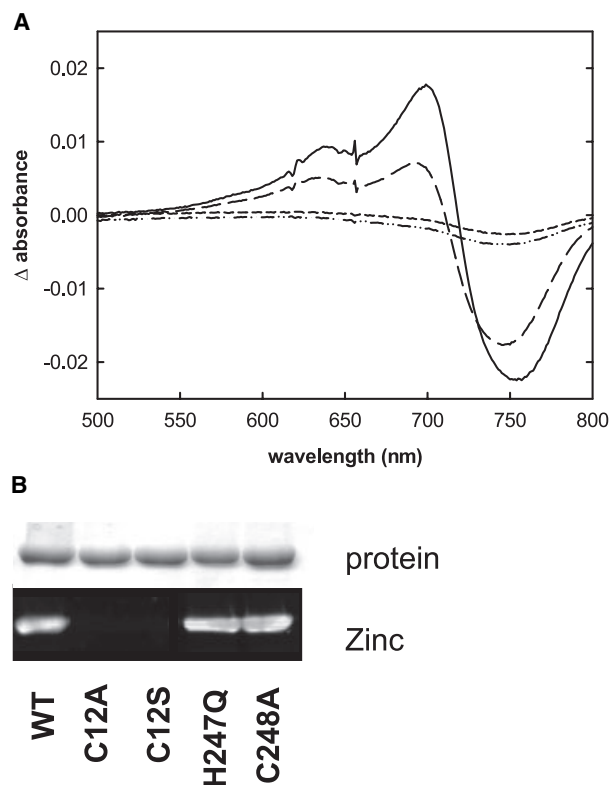
**Table 1.** Spectral properties of BphP reconstituted with different chromophores. ND, not detected.

	$\lambda$ ( $\Delta A_{\max}$ ) (nm)	$\lambda$ ( $\Delta A_{\max}$ ) (nm)	$\Delta A_{\max}$	$\Delta A_{\min}$	$\Delta \Delta A$
Biliverdin IX $\alpha$	700	754	0.022	−0.026	0.048
Biliverdin IX $\beta$	ND	ND	ND	ND	ND
Biliverdin IX $\delta$	700	756	0.003	−0.004	0.008
Biliverdin IX $\gamma$	ND	ND	ND	ND	ND
Mesobiliverdin	683	734	0.006	−0.012	0.018
Dihydrobiliverdin	ND	743	0.000	−0.010	0.010
Biliverdin III $\alpha$	ND	757	0.000	−0.009	0.009
Biliverdin XIII $\alpha$	700	746	0.009	−0.012	0.021



**Fig. 4.** Phytofluor fluorescence spectra of BphP incubated with 15,16-dihydrobiliverdin. Fluorescence excitation (dashed) and emission spectra (solid) of the phytofluor obtained after incubation of apo-BphP with 15,16-dihydrobiliverdin. The excitation spectrum was monitored with an emission wavelength of 630 nm. The emission spectrum was obtained at an excitation wavelength of 570 nm. Structure of 15, 16-dihydrobiliverdin is also shown.

not shown). These results imply that the site of chromophore attachment in *P. aeruginosa* BphP is most likely a cysteine residue. BphP contains twelve cysteine residues, two of which, at position 12 and 248, could possibly serve as the chromophore-binding site. A cysteine corresponding to position 12 has already been reported to be the site of chromophore attachment in Agp1 from *A. tumefaciens* [7,21]. C248 is located within the BLD and is adjacent to the chromophore-binding site in cyanobacterial and plant phytochromes. To further investigate the potential site of chromophore attachment, site-directed mutants (C12A, C12S and C248A) were generated and analyzed using the above methods. Neither BphP C12A nor C12S showed characteristic difference spectra. The difference spectra of these variants (Fig. 5A) were very similar to the iodoacetamide-blocked wild-type spectra (data not shown). The variant BphP C248A was able to form a photoconvertible holoform with maximum and minimum identical with those of the wild-type (Table 2). Only the C248A variant showed covalent biliverdin binding, as demonstrated by zinc-induced red fluorescence (Fig. 5B). The covalent attachment of biliverdin to BphP was further confirmed using a biliverdin reductase (BVR) assay. In this assay, only free biliverdin can be converted by BVR into bilirubin. The addition of BVR and NADPH to C12A: biliverdin and C12S: biliverdin resulted in the conversion of the bound



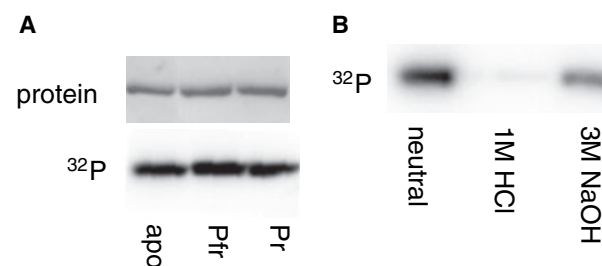
**Fig. 5.** (A) Absorbance difference spectra of BphP variants with biliverdin IX $\alpha$ . Difference spectra of BphP C248A (solid line), BphP H247Q (long dashed line), BphP C12S (short dashed line) and BphP C12A (dotted line). (B) Zinc-induced red fluorescence. ApoBphP wild-type and variants were incubated with biliverdin IX $\alpha$ , and, after SDS/PAGE (labeled protein) and electroblotting, covalently bound bilins were visualized using zinc-induced red fluorescence (labeled zinc).

biliverdin into bilirubin, which was accompanied by a color change from green to yellow, indicating the formation of bilirubin. No biliverdin conversion was detected after addition of BVR to wild-type BphP and the other variants investigated (data not shown). Overall, these results are in agreement with the data from Agp1 and indicate the importance of Cys12 in covalent chromophore binding.

Besides this N-terminally located cysteine residue, a histidine residue in the BLD has been discussed as the chromophore-binding site in *Deinococcus radiodurans* BphP and *Calothrix* sp. PCC7601 CphB [1,23]. This histidine residue is located adjacent to the conserved cysteine residue in cyanobacterial and plant phytochromes. To investigate the role of this histidine residue, a H247Q mutant was generated. H247Q was able to form a photoconvertible holoform with blue-shifted extrema (694 and 746 nm) (Table 2). For this variant, covalent biliverdin binding was demonstrated using zinc-induced red fluorescence and the BVR assay (data not shown).

**Table 2.** Spectral properties of BphP variants assembled with biliverdin IX $\alpha$ .

	Maximum (nm)	Minimum (nm)
Wild-type	700	754
C248A	700	754
H247Q	694	746
C12A	–	750
C12S	–	750



**Fig. 6.** Autoradiogram of BphP. Autoradiogram after [ $^{32}$ P]ATP[ $\gamma$ P] labeling, SDS/PAGE and electroblotting. (A) Autoradiogram of the apo and holo forms of BphP. (B) Stability of the autophosphorylation after incubation for 1 h at room temperature in 50 mM Tris (pH 7.0)/1 M HCl/3 M NaOH.

### Autophosphorylation of BphP

Light-regulated His phosphorylation has been demonstrated for several bacterial phytochromes. Amino-acid sequence analysis revealed that BphP also contains a histidine kinase module (Scheme 1). Autophosphorylation of BphP was determined after incubation of purified apo-BphP and holo-BphP (Pr and Pfr form) with [ $^{32}$ P]ATP[ $\gamma$ P]. Both forms of BphP displayed autophosphorylation activity (Fig. 6A). Although the Pfr-enriched form shows slightly higher kinase activity, no strong light-dependence could be detected. BphP was confirmed to be a histidine kinase, as the phosphorylation was stable in alkaline solution and labile in acid (Fig. 6B). This was further confirmed by replacing the potential phosphorylation site (H513) by alanine. No autophosphorylation was detected in this H513A mutant (data not shown).

### Discussion

#### *Pa*BphP is a bacterial phytochrome using a biliverdin chromophore

*Pa*BphP was among the first bacterial phytochromes to be discovered, and it has already been shown that this BphP together with other members of this phytochrome class utilizes a biliverdin chromophore [1,9,15].

Our laboratory has recently demonstrated that the *PaBphP* chromophore is produced by one of the two *P. aeruginosa* heme oxygenases. The BphO heme oxygenase is encoded in the same operon as *bphP*, and we were able to show that BphP is involved in the release of the biliverdin produced from BphO. The major function of BphP remains unknown, but these results provide biochemical evidence that recombinant BphP has all the characteristics of a red/far-red-light-responsive photoreceptor.

To date only a few bacterial phytochromes have been biochemically characterized in detail. Among them are Agp1 and Agp2 (also known as *AtBphP1* and *AtBphP2*) from *A. tumefaciens*. The most interesting spectral observation for several BphPs including *PaBphP* is the Pfr-like ground state [8,16]. Assembly of *PaBphP* with biliverdin first generates a transient Pr-like intermediate, which is then nonphotochemically transformed into a stable Pfr-enriched form (Fig. 2A). Interestingly, illumination with red light does not fully convert this form into a solely Pfr form (Fig. 2C). The Pfr-enriched form found after dark assembly is different from that obtained through dark conversion of either the Pr or Pfr forms (Fig. 2B,C). Incubation of pre-illuminated BphP always resulted in the formation of a Pr/Pfr equilibrium in the dark.

Although autophosphorylation activity was demonstrated for BphP, only a weak light-dependence has been observed with the Pfr-enriched form displaying highest kinase activity. However, this may also be due to the amount of Pr present in the Pfr-enriched form. The observed Pfr ground state is the opposite of that used by almost all other known members of the classic phytochrome family [12,24]. More recent reports also revealed the presence of the Pfr ground state in Agp2 from *A. tumefaciens* and the BphPs of *Rhodospseudomonas palustris* and *Bradyrhizobium* ORS278 [8,16]. For the latter organisms, the Pfr ground state has been implicated to be necessary for maximal photoregulation of photosynthesis by not overlapping with chlorophyll absorption [16]. The reason for the Pfr ground state in Agp2 and *PaBphP* is still not known, but if *PaBphP* indeed functions as a photoreceptor in *P. aeruginosa*, it would be expected to serve as a sensor of the ratio between far-red and red light.

### **An A-ring endo-vinyl group is required for covalent attachment**

Our data obtained using biliverdin derivatives and site-directed mutagenesis of *PaBphP* are in agreement with data obtained for Agp1 from *A. tumefaciens* [7,21]. Both BphPs seem to covalently bind the biliverdin

chromophore at a conserved cysteine residue in the P2 domain close to the N-terminus of the protein. An A-ring endo-vinyl group of the chromophore is absolutely required for this covalent attachment [15,21]. Our data support the proposal that the lack of the conserved cysteine residue in the BLD correlates with the use of biliverdin as the chromophore and the binding to a conserved cysteine residue in the P2 domain [25]. Nevertheless, the BLD still seems to be quite important for the photochemical reaction, as a H247Q mutation resulted in a spectral shift of the Pr and Pfr forms. Therefore, the BLD may play a role in stabilization and co-ordination of the chromophore and possibly its covalent attachment to Cys12 (i.e. the bilin lyase function).

Interestingly, *PaBphP* Cys12 mutants assembled biliverdin, but the affinity of biliverdin was about fivefold lower than wild-type BphP. The assembled Cys12 variants displayed a Pr-like absorption spectrum, which did not alter upon red-light illumination (data not shown). This observation is in contrast with data obtained for Agp1. An Agp1 C20A mutant was fully photoreversible, but had a reduced absorption coefficient, a blue-shifted Pfr maximum, and a reduced ratio of Pfr to Pr absorption [7]. In the case of *PaBphP*, the mutation of this conserved cysteine residue is much more dramatic than in Agp1. It seems that, in *PaBphP*, mutation of this residue not only abolishes covalent binding, but stabilization of the Pfr form is also lost. This may be due to a loosely or wrongly oriented biliverdin in the chromophore pocket. At this point it is worth mentioning that, although many of our data point towards Cys12 as the site of covalent chromophore attachment, it still cannot be ruled out that this cysteine residue only plays a structural role (i.e. disulfide bond formation). Consequently, its mutation would lead to a loss of the structural environment necessary for covalent binding.

### **Photoconversion of BphPs involves 15Z/15E isomerization**

Since the discovery of BphPs, it has always been assumed that the photochemical reaction is similar to that found in plant phytochromes, which involves a 15Z/15E isomerization of the phytochromobilin chromophore [17]. This assumption has not yet been experimentally confirmed. We used a chromophore analog that lacks the C15/C16 double bond to investigate the photoisomerization of BphP. The phytofluor adduct obtained confirmed the involvement of the C15/C16 double bond in photoisomerization, as the dihydrobiliverdin adduct is highly fluorescent. Further-

more, these data imply that, although the chromophore is attached at a different position, the geometry of the chromophore-binding pocket in *PaBphP* is probably similar to that of plant phytochromes.

## Conclusion and outlook

We have shown that recombinant *PaBphP* has all features of a 'true' phytochrome photoreceptor. It covalently binds a biliverdin chromophore, which, upon illumination with red and far-red light, photoisomerizes at the C15/C16 double bond. Furthermore, we confirmed that *PaBphP* is a histidine kinase. The results of this work support the proposal of a separate bacterial phytochrome class with a new chromophore-binding site in the P2 domain, although a solely structural role for this residue cannot be completely ruled out. The function of BphPs in nonphotosynthetic micro-organisms remains a mystery. To elucidate this further, we have constructed chromosomal knock-out mutations in the *P. aeruginosa* *bphOP* operon, which are currently being investigated using proteomic and transcriptomics analysis.

## Experimental procedures

### Reagents

All chemicals were purchased from Sigma (Munich, Germany) and were American Chemical Society grade or better. Restriction enzymes were from Invitrogen (Cleveland, OH, USA). MasterTaq<sup>TM</sup> was purchased from Eppendorf Scientific (Westbury, NY, USA). The expression vector pASK-IBA3, Strep Tactin Sepharose, and anhydrotetracycline were obtained from IBA GmbH (Göttingen, Germany). Centricon-10 concentrator devices were purchased from Amicon (Beverly, MA, USA). Biliverdin IX $\alpha$  was obtained from Frontier Scientific (Logan, UT, USA).

### Bilin preparations

15,16-Dihydrobiliverdin, biliverdin IX $\beta$ , biliverdin IX $\gamma$ , biliverdin IX $\delta$  and phycocyanobilin were prepared as described previously [15,20]. Biliverdin XIII $\alpha$ , biliverdin III $\alpha$ , 3<sup>1</sup>,3<sup>2</sup>-dihydrobiliverdin and mesobiliverdin were gifts from J.C. Lagarias (UC Davis, CA, USA) and K. Inomata (Kanazawa University, Japan) [21,26,27].

### Construction of expression vectors

The *P. aeruginosa* *bphP* (PA 4117) gene was amplified by PCR from chromosomal DNA using a hot start protocol with the following primers, which contained the indicated and underlined restriction sites: *bphPXbaRBS*fwd:

5'-CGTCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGACGAGCATCACCCGGTTACC-3'; *bphPXhonoSTOP*rev: 5'-CCCTCGAGGGACGAGGAGCCGGTCTCCG-3'. The PCR product was digested with the indicated enzymes and cloned into *XbaI/XhoI*-digested expression vector pASK-IBA3 (IBA). The integrity of the plasmid construct was verified by DNA sequence determination of the insert (SeqLab, Göttingen, Germany). The resulting ORF encodes BphP with a C-terminal Strep Tag with a total addition of 20 amino-acid residues under the control of a *tet* promoter. Site-directed mutagenesis of *bphP* was performed using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), according to the instructions of the manufacturer with the following primers (only one primer shown, second primer is complement, the underlined codon represents the introduced mutation). *bphP* C12A, 5'-GGT TACCCTGGCGAACGCCGGAGGACGAACCCATCC-3'; *bphP* C12S 5'-GGTTACCCTGGCGAACTCCGAGGACGAACCCATCC-3'; *bphP* H247Q, 5'-GCAGCGTTTCG CCGATCCAGTGCGAATACCTGACC-3'; *bphP* C248A, 5'-CGTTTCGCCGATCCACGCCGGAATACCTGACCAAC-3' and *bphP* H513A, 5'-GCGGTGCTCGGCGCCGACCTGCGCAAC-3'. Mutants were also confirmed by DNA sequencing (SeqLab).

### Protein production and purification

Recombinant *P. aeruginosa* BphP was produced using a *tet* promoter-driven Strep tag system ([28]; IBA) in the *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  and was grown at 37 °C in Luria-Bertani medium containing ampicillin (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) to an  $A_{578}$  of 0.5. Cultures were induced by the addition of 0.2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  anhydrotetracycline and incubated at 25 °C overnight. The bacterial pellet from 3 L of culture was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% Triton X-100) (3 mL buffer per g of cells) and disrupted by sonication. Cell debris was removed by ultracentrifugation (30 min, 100 000  $g$ ), and the supernatant was subjected to a 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cut. The resultant pellet was dissolved in buffer W (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 20 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol), and after 20 min centrifugation (23 000  $g$ ), the supernatant was incubated with 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  avidin (final concentration) for at least 10 min on ice. The resulting supernatant was loaded on to a Strep-Tactin Sepharose column (5 mL), which had previously been equilibrated with buffer W. The purification was performed according to the instructions supplied by the manufacturer (IBA). Fractions containing BphP were further purified using anion-exchange chromatography on Q Sepharose (Amersham Biosciences) using a linear gradient of KCl (0–1 M) in 50 mM Hepes/KOH, pH 8.0. BphP was eluted with 500 mM KCl from the Q Sepharose column.

## Protein determination

Protein concentration was determined by the Bradford method with BSA as standard [29] or by measuring  $A_{280}$  using the calculated  $\epsilon_{280\text{nm}} = 78\,457\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  for BphP [30].

## Analytical gel permeation chromatography

Gel permeation chromatography experiments were carried out using a Superdex 200 HR10/30 column as described previously [15].

## Assembly of PaBphP

*In vitro* chromophore assembly of PaBphP was tested using 20  $\mu\text{M}$  recombinant apo-BphP, which was incubated with 40  $\mu\text{M}$  chromophore for 30 min at room temperature in the dark (final volume 50  $\mu\text{L}$ ). Absorbance spectra were obtained after 3 min of incubation with red light at 630 nm (Pfr spectrum) and after 3 min of incubation with far red light at 750 nm (Pr spectrum) in a volume of 500  $\mu\text{L}$  (50 mM Hepes/HCl, pH 8.0, 20 mM KCl), and the difference was calculated.

To characterize the different forms of holo-BphP spectroscopically, absorbance spectra between 500 and 800 nm were obtained. Biliverdin IX $\alpha$  (20  $\mu\text{M}$ ) was added to 10  $\mu\text{M}$  BphP in a final volume of 500  $\mu\text{L}$ , and spectra were measured during incubation in the dark or during irradiation with red and far red light, respectively.

To test covalent chromophore attachment to BphP, covalently bound bilins were visualized by zinc-induced red fluorescence as described previously [31]. For iodoacetamide treatment, BphP apoprotein was mixed with different concentrations of the blocking reagent from a 5 mM stock solution and incubated for 20 min at room temperature [32]. Spectra and zinc-induced red fluorescence were measured as described above.

## Fluorescence spectroscopy

Room temperature fluorescence emission and excitation spectra were recorded using a Perkin–Elmer LS50B spectrofluorimeter. Fluorescence spectra were measured at 570 nm excitation (the absorption maximum of dihydrobiliverdin) or at 630 nm emission.

## BVR assay

A BVR assay was used to characterize the complex of BphP–biliverdin IX $\alpha$ . BVR catalyzes the conversion of biliverdin IX $\alpha$  into bilirubin IX $\alpha$ , which absorbs at 450 nm. BVR can only convert noncovalently bound biliverdin IX $\alpha$  into bilirubin. Apo-BphP was incubated with an excess of

biliverdin IX $\alpha$  for 30 min in the dark. The BphP–biliverdin complex was separated from free biliverdin IX $\alpha$  using NAP-5 desalting columns (Amersham Biosciences), which were equilibrated with buffer (100 mM Tris/HCl, pH 8.7). The concentration of protein-bound biliverdin IX $\alpha$  was measured spectroscopically and estimated using  $\epsilon_{680} = 12\,400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  for free biliverdin IX $\alpha$ . An aliquot of  $\approx 5\text{ }\mu\text{g}$  crude soluble protein extract of recombinant rat BVR was added to 20  $\mu\text{M}$  biliverdin in a complex of BphP–biliverdin in 100 mM Tris/HCl, pH 8.7. The reaction was started by the addition of an NADPH-regenerating system containing 6.5 mM glucose 6-phosphate, 0.82 mM NADP $^{+}$  and 1.1 U·mL $^{-1}$  glucose-6-phosphate dehydrogenase. Spectral changes between 300 and 800 nm were monitored.

## Protein kinase assays

Autophosphorylation was performed as described for Cph1 [6]. Holo-BphP was irradiated with saturating red (630 nm) or far-red (750 nm) light before the addition of [ $^{32}\text{P}$ ]ATP[ $\gamma\text{P}$ ] and subsequently incubated for 30 min at room temperature with the corresponding light. Radioisotope imaging was monitored using a Bio-Rad Molecular Imager FX.

## Acknowledgements

We are grateful to Drs Inomata (Kanazawa University, Kanazawa, Japan) and Lagarias (UC Davis, Davis, CA, USA) for the gift of chromophores. We thank Maria Sowa and Thorben Dammeyer for technical assistance. This work was supported by the Emmy-Noether-Program of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and funds from the Fonds der Chemischen Industrie to N.F.-D.

## References

- 1 Davis SJ, Vener AV & Vierstra RD (1999) Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from non-photosynthetic eubacteria. *Science* **286**, 2517–2520.
- 2 Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y & Wagner D (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**, 675–680.
- 3 Lagarias JC & Rapoport H (1980) Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the Pr form of the phytochrome chromophore. *J Am Chem Soc* **102**, 4821–4828.
- 4 Terry MJ, Wahleithner JA & Lagarias JC (1993) Biosynthesis of the plant photoreceptor phytochrome. *Arch Biochem Biophys* **306**, 1–15.
- 5 Hughes J, Lamparter T, Mittmann F, Hartmann E, Gärtner W, Wilde A & Börner T (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**, 663.

- 6 Yeh KC, Wu SH, Murphy JT & Lagarias JC (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**, 1505–1508.
- 7 Lamparter T, Michael N, Mittmann F & Esteban B (2002) Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11628–11633.
- 8 Karniol B & Vierstra RD (2003) The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 2807–2812.
- 9 Bhoo SH, Davis SJ, Walker J, Karniol B & Vierstra RD (2001) Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* **414**, 776–779.
- 10 Wu SH & Lagarias JC (2000) Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry* **39**, 13487–13495.
- 11 Aravind L & Ponting CP (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22**, 458–459.
- 12 Montgomery BL & Lagarias JC (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* **7**, 357–366.
- 13 Huang ZJ, Edery I & Rosbash M (1993) PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* **364**, 259–262.
- 14 Lamparter T, Carrascal M, Michael N, Martinez E, Rottwinkel G & Abian J (2004) The biliverdin chromophore binds covalently to a conserved cysteine residue in the N-terminus of *Agrobacterium* phytochrome Agp1. *Biochemistry* **43**, 3659–3669.
- 15 Wegele R, Tasler R, Zeng Y, Rivera M & Frankenberg-Dinkel N (2004) The heme oxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **279**, 45791–45802.
- 16 Giraud E, Fardoux J, Fourrier N, Hannibal L, Genty B, Bouyer P, Dreyfus B & Vermeglio A (2002) Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* **417**, 202–205.
- 17 Li L & Lagarias JC (1992) Phytochrome assembly. Defining chromophore structural requirements for covalent attachment and photoreversibility. *J Biol Chem* **267**, 19204–19210.
- 18 Li L, Murphy JT & Lagarias JC (1995) Continuous fluorescence assay of phytochrome assembly *in vitro*. *Biochemistry* **34**, 7923–7930.
- 19 Murphy JT & Lagarias JC (1997) The phytofluors: a new class of fluorescent protein probes. *Curr Biol* **7**, 870–876.
- 20 Frankenberg N, Mukougawa K, Kohchi T & Lagarias JC (2001) Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell* **13**, 965–978.
- 21 Lamparter T, Michael N, Caspani O, Miyata T, Shirai K & Inomata K (2003) Biliverdin binds covalently to agrobacterium phytochrome Agp1 via its ring A vinyl side chain. *J Biol Chem* **278**, 33786–33792.
- 22 Jorissen HJ, Quest B, Remberg A, Coursin T, Braslavsky SE, Schaffner K, de Marsac NT & Gärtner W (2002) Two independent, light-sensing two-component systems in a filamentous cyanobacterium. *Eur J Biochem* **269**, 2662–2671.
- 23 Quest B & Gärtner W (2004) Chromophore selectivity in bacterial phytochromes: dissecting the process of chromophore attachment. *Eur J Biochem* **271**, 1117–1126.
- 24 Smith H (2000) Phytochromes and light signal perception by plants: an emerging synthesis. *Nature* **407**, 585–591.
- 25 Lamparter T (2004) Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Lett* **573**, 1–5.
- 26 Elich TD, McDonagh AF, Palma LA & Lagarias JC (1989) Phytochrome chromophore biosynthesis. Treatment of tetrapyrrole-deficient *Avena* explants with natural and non-natural bilatrienes leads to formation of spectrally active holoproteins. *J Biol Chem* **264**, 183–189.
- 27 Cornejo J, Beale SI, Terry MJ & Lagarias JC (1992) Phytochrome assembly: the structure and biological activity of 2(R),3(E)-phytychromobilin derived from phycobiliproteins. *J Biol Chem* **267**, 14790–14798.
- 28 Skerra A (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131–135.
- 29 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- 30 Gill SC & von Hippel PH (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence. *Anal Biochem* **182**, 319–326.
- 31 Berkelman TR & Lagarias JC (1986) Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **156**, 194–201.
- 32 Lamparter T, Esteban B & Hughes J (2001) Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur J Biochem* **268**, 4720–4730.

Anhang 3

The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in  
red light

(Blumenstein *et al.* (2005) *Curr. Biol.* 15, 1-6.)



# The *Aspergillus nidulans* Phytochrome FphA Represses Sexual Development in Red Light

Anne Blumenstein,<sup>1,2,5</sup> Kay Vienken,<sup>1,2,4,5</sup>  
Ronja Tasler,<sup>3</sup> Janina Purschwitz,<sup>2</sup>  
Daniel Veith,<sup>1,2,4</sup> Nicole Frankenberg-Dinkel,<sup>3</sup>  
and Reinhard Fischer<sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology  
Karl-von-Frisch-Str.  
D-35042 Marburg  
Germany

<sup>2</sup>Department of Applied Microbiology  
Institute for Applied Life Sciences  
University of Karlsruhe  
Hertzstrasse 16  
D-76187 Karlsruhe  
Germany

<sup>3</sup>Institute for Microbiology  
Technical University of Braunschweig  
Spielmannstr. 7  
D-38106 Braunschweig  
Germany

## Summary

Phytochrome photoreceptors sense red and far-red light through photointerconversion between two stable conformations, a process mediated by a linear tetrapyrrole chromophore [1]. Originally, phytochromes were thought to be confined to photosynthetic organisms including cyanobacteria, but they have been recently discovered in heterotrophic bacteria and fungi, where little is known about their functions [2, 3]. It was shown previously in the ascomycetous fungus *Aspergillus nidulans* that asexual sporulation is stimulated and sexual development repressed by red light [4]. The effect was reminiscent of a phytochrome response, and indeed phytochrome-like proteins were detected in several fungal genomes [5]. All fungal homologs are more similar to bacterial than plant phytochromes and have multifunctional domains where the phytochrome region and histidine kinase domain are combined in a single protein with a C-terminal response-regulator domain. Here, we show that the *A. nidulans* phytochrome FphA binds a biliverdin chromophore, acts as a red-light sensor, and represses sexual development under red-light conditions. FphA-GFP is cytoplasmic and excluded from the nuclei, suggesting that red-light photoperception occurs in the cytoplasm. This is the first phytochrome experimentally characterized outside the plant and bacterial kingdoms and the second type of fungal protein identified that functions in photoperception.

## Results

### *A. nidulans* FphA Is More Closely Related to Bacterial than to Plant Phytochromes and Covalently Binds Biliverdin

We identified putative phytochrome proteins (*fph* = fungal phytochrome) in the genomes of several ascomycetous fungi such as *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *Gibberella moniliformis*, and the basidiomycetes *Ustilago maydis* and *Cryptococcus neoformans* but not in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, or *Ashbya gossypii*. Fungal phytochromes share several characteristic domains with phytochromes from plants and bacteria (Figure 1A). All phytochromes are composed of a photosensory input domain at their N terminus and a regulatory output domain at the C terminus. The input domain consists of P2, GAF, and PHY subdomains, and the output domains are usually more diverged but contain a histidine kinase domain (HKD) [6]. Some bacterial phytochromes carry an additional response-regulator domain (RRD), a second module known from bacterial two-component systems. Similarly, the output domain of fungal phytochromes accommodates a HKD and a RRD (Figure 1A).

The close relationship between bacterial and fungal phytochromes is further supported by similarities in their putative chromophore binding region (Figure 1B). Plant and cyanobacterial phytochromes harbor within their GAF domain a conserved cysteine residue that covalently attaches phytochromobilin or phycocyanobilin, respectively. *A. nidulans* FphA lacks this cysteine residue but has an isoleucine residue instead (Figure 1B). On the other hand, it has been shown that Agp1 from *A. tumefaciens* and BphP from *P. aeruginosa* covalently attach a biliverdin chromophore at a conserved cysteine residue within the P2 domain. Interestingly, this cysteine is also present in FphA (C195) and is likely to be the site of chromophore attachment (see below) (Figure 1B). These sequence-based results and a phylogenetic analysis of the GAF domain suggest that fungal phytochromes are more closely related to bacterial than to plant phytochromes, and they might have evolved from a bacterial progenitor (Figure 1C) (see also [5]).

To ascertain the role of phytochromes in a filamentous fungus, we have characterized FphA from *A. nidulans*. The open reading frame is interrupted by one 56 bp intron at the 3'-end of the transcript. The deduced protein consists of 1280 amino acids, with a calculated molecular mass of 140 kDa and an isoelectric point of 5.2. To establish whether FphA is able to autoassemble with linear tetrapyrroles, a feature unique to phytochromes, we expressed the gene together with a gene encoding the *Synechocystis* sp. heme oxygenase in *E. coli* [7]. This system enables us to provide biliverdin, which is produced by the heme oxygenase, during the expression. Recombinant FphA autoassembled with biliverdin in *E. coli*, and the resultant holo-FphA revealed a typical red, far-red photoreversible phytochrome signature (Figure 2A). Both forms (Pr and Pfr) are considerably shifted toward longer wavelengths, as are the

\*Correspondence: reinhard.fischer@bio.uni-karlsruhe.de

<sup>4</sup>Present address: Department of Applied Microbiology, Institute for Applied Life Sciences, University of Karlsruhe, Hertzstrasse 16, D-76187 Karlsruhe, Germany.

<sup>5</sup>These authors contributed equally to this work.

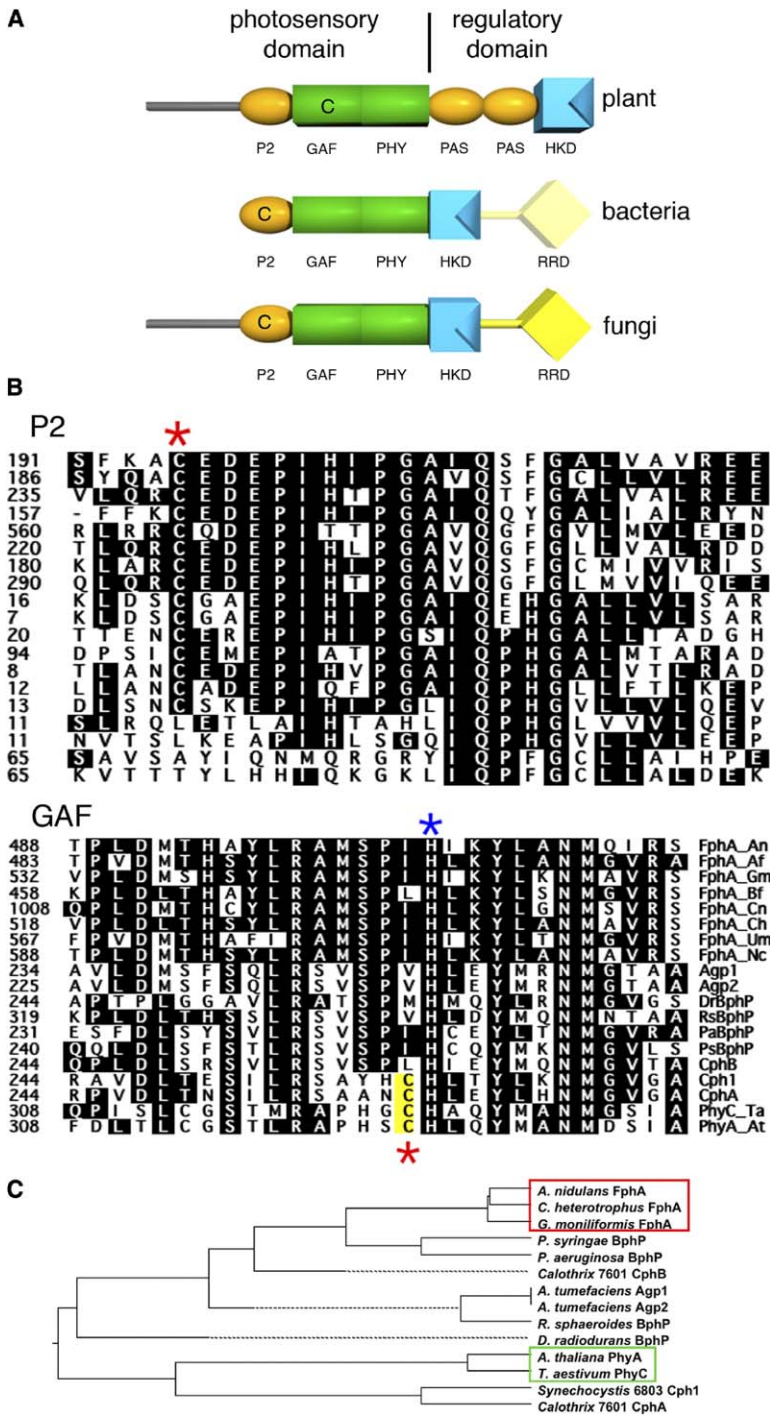


Figure 1. Sequence Analysis of Plant, Bacterial, and Fungal Phytochromes

(A) Domain structure of plant, bacterial, and fungal phytochromes. The following abbreviations are used: P2, a PAS domain; GAF, small ligand binding domain (cGMP-specific phosphodiesterases, cyanobacterial adenylate cyclases, and formate hydrogen lyase transcription activator FhlA); PHY, phytochrome domain; PAS, PER, ARNT, SIM repeats; HKD, histidine kinase domain; RRD, response-regulator domain; and C, conserved cysteine residue involved in covalent chromophore binding.

(B) Amino acid sequence alignment of the two putative chromophore binding regions. On the top, the putative chromophore binding region of bacterial phytochromes, which is located within the P2 domain, is shown. On the bottom, parts of the GAF shown to be the site for chromophore attachment in cyanobacterial and plant phytochromes are shown. Asterisks identify cysteine and histidine residues involved in chromophore binding. Black background denotes identical residues.

(C) Phylogenetic relation of GAF domains from selected phytochromes listed in (B). The red box indicates GAF domains from fungi, and the green box indicates GAF domains from plants. The *A. nidulans fphA* sequence was deposited in the Genbank database under the accession number AJ867583.

BphPs in comparison to plant phytochromes. This result is in good agreement with the action spectrum of light-mediated conidiation in *A. nidulans*, where light with a wavelength of 680 nm was maximally effective [4]. Covalent attachment of the biliverdin chromophore was confirmed by zinc-induced red fluorescence (Figure 2B). Red fluorescence is due to the interaction between zinc and covalently attached linear tetrapyrrole molecules. To determine the site of chromophore attach-

ment, we mutagenized the conserved cysteine residue 195. Indeed, this mutation led to a lack of chromophore binding, which in turn resulted in the lack of photoreversibility and zinc-induced red fluorescence (Figures 2A and 2B). Autoassembly was further tested with phycocyanobilin, a chromophore similar to plant phytochrome chromophores. Recombinant FphA autoassembled phycocyanobilin, but the resultant holo-FphA displayed a much weaker photoactivity (data not

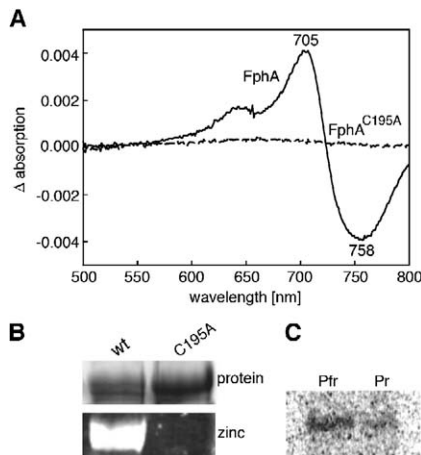


Figure 2. In Vivo Assembly of Recombinant *A. nidulans* FphA by Coexpression of the Apoprotein with a Heme Oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in *E. coli*

(A) Absorbance-difference spectrum of wild-type (wt) strain and C195A mutant after saturation with red (630 nm) and far-red (750 nm) light.

(B) Zinc-induced red fluorescence (labeled zinc) of equal amounts of wild-type and C195A protein after SDS-PAGE analysis (labeled protein) and electroblotting.

(C) Autoradiogram of FphA Pr and Pfr-forms. Autoradiogram after [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP-labeling, SDS-PAGE, and electroblotting is shown.

shown). These results suggest that BV is likely to be the natural chromophore of FphA. Autophosphorylation of FphA was determined after incubating purified holo-FphA (Pr and Pfr form) with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. Both forms of FphA displayed weak autophosphorylation activity (Figure 2C).

#### FphA Is a Red-Light Sensor in *A. nidulans*

To analyze the function of *fphA* in *A. nidulans*, we have created an *A. nidulans fphA* null mutant by homologous-gene replacement and compared this strain (SAB2) with a wild-type strain (FGSC4) (Figure 3). It has already been shown that in wild-type strains, sexual development is repressed in the presence of red light, whereas under far-red-light conditions, the block does not occur. If a red-light pulse is followed by a far-red-light pulse, *A. nidulans* develops as under far-red-light conditions. In the dark, the balance between asexual and sexual development is shifted toward meiotic reproduction. It was demonstrated that the mycelium has to acquire developmental competence to make it light sensitive and that the sensitivity is restricted to a window of 6 hr after induction of asexual development [4].

Comparing the  $\Delta fphA$ -strain with the wild-type, we found that the red-light block of sexual development at 670 nm was largely reduced in the *fphA* mutant (Figures 3A and 3B). Incubation of the strains in the dark or in dark-red light (740 nm) led mainly to sexual development, visible as a yellowish color of the colonies. The yellow color is caused by the young cleistothecia, which are embedded into yellow nurse cells, called Hülle cells. In red light, the *fphA* mutant still developed sexually, whereas the wild-type produced green colo-

nies, indicating asexual sporulation. However, the *fphA* mutant produced only about 10% of the number of cleistothecia in comparison to the incubation in the dark. These results suggest that FphA is required for photosensing in *A. nidulans* but indicate that it is not the only sensor for red light (Figure 3D).

#### FphA Resides in the Cytoplasm

To determine where red-light perception could take place in *A. nidulans*, we tagged FphA C- or N-terminally with GFP. Although the protein was predicted to be nuclear (74% probability, pSortII), we found fluorescence of both constructs in the cytoplasm, and FphA appeared to be excluded from nuclei (Figure 4A). The tagged FphA proteins were proven to be biologically functional by complementation of the  $\Delta fphA$  mutation. The localization pattern did not change in hyphae grown on a coverslip after illumination with red light (results not shown). Cytoplasmic localization of FphA was confirmed by C-terminal HA-tagging and subsequent immunostaining (data not shown).

To analyze the subcellular localization of FphA with a different method, we fractionated crude-cell extracts by centrifugation and detected FphA as HA-fusion protein. We found FphA quantitatively in the pellet fraction after 100,000  $\times$  g centrifugation (Figure 4B). The protein could be released into the supernatant after treatment of the fraction with detergent. This result could be explained if FphA is either membrane associated or forms a large protein complex in the cytoplasm. The GFP-localization data support the second alternative.

To analyze whether FphA molecules are able to physically interact, we applied the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) system [8]. This system is comparable to the yeast two-hybrid system. Two candidate proteins are each fused with one-half of a fluorescent protein. Interaction of the given proteins restores the full fluorescent protein. We adapted this system for *A. nidulans* and expressed the corresponding plasmids pJP4 and pJP5 alone and in combination in GR5. Fluorescence was obtained in the cytoplasm, when both plasmids were cotransformed (Figure 4C). When either of the FphA fusion proteins was expressed individually, or in combination with other tagged proteins (e.g., ApsB), no fluorescence was detected (not shown).

#### Discussion

In this study, we demonstrated that FphA is a fungal phytochrome that is able to form a photoactive holo-protein with linear tetrapyrroles, has kinase activity, and is likely to act as a red-light sensor. The discovery of a role for this phytochrome has important implications for the understanding of the photobiology of fungi. Fascinating work has been done in recent years to understand the blue-light response in *N. crassa* and other fungi [9]. Two proteins, WC-1 and WC-2, are central components of this system. One major breakthrough was the discovery of a flavin (FAD) as the chromophore in WC-1 [9, 10]. Because WC-1 is located in the nucleus and acts as a transcription factor, no further signaling cascade appears to be necessary [11]. The analysis of the phytochrome response in this paper is thus the sec-



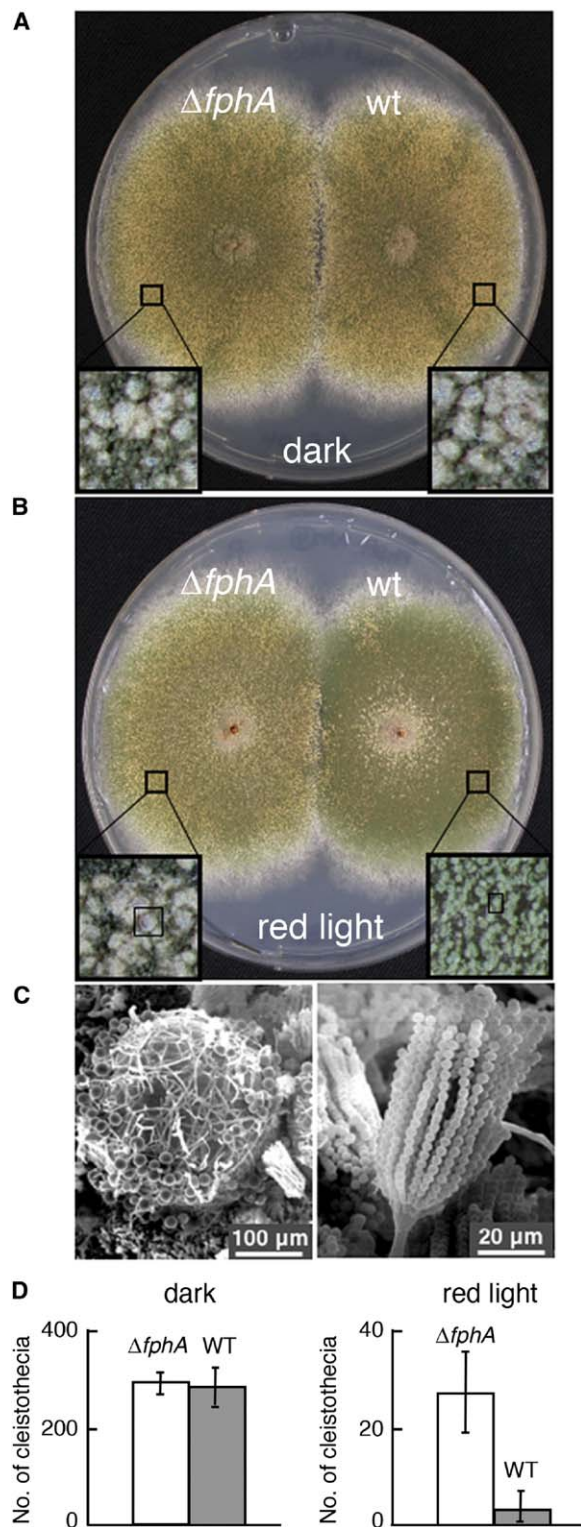


Figure 3. Deletion of *fphA*

(A and B) Strain SAB2 ( $\Delta fphA$ ) and FGSC4 (wt) were point-inoculated on agar plates and incubated in the dark (A) or under red-light illumination (670 nm) (B). The indicated areas were enlarged and displayed as inserts.

(C) Scanning electron microscopic pictures showing the developmental structures. On the left, cleistothecium with attached Hülle

cells and hyphae is shown. A conidiophore is visible in the right-bottom corner. On the right, enlargement of a conidiophore is shown.

(D) Quantification of the number of cleistothecia. The error bars represent the standard deviation of ten independent countings.

ond example of how fungi sense light and adapt to their environment.

We showed that FphA expressed in *E. coli* assembles well with biliverdin, whereas the attachment of phycocyanobilin was less effective. From these results and the fact that the chromophore attachment site is similar to the ones found in biliverdin binding BphPs, we hypothesize that biliverdin is the natural chromophore of FphA. However, it has to be noted that the peaks in the difference spectrum (Figure 2) were slightly different from the peaks of the action spectrum [4]. The discrepancy may be due to the fact that the natural chromophore in *A. nidulans* is different from biliverdin and thus has different spectroscopic properties. To solve this question, FphA needs to be purified from *A. nidulans* and the structure of the chromophore determined. The question remains how *A. nidulans* produces linear tetrapyrroles. Although several fungi contain heme oxygenases [12], we did not find any similar sequences in *A. nidulans*. This could be due to low homologies between heme oxygenases [13], or the reaction could be performed by a novel enzyme, different from the ones identified to date. A similar scenario has been discovered recently in *Staphylococcus aureus* [14].

The detection of FphA autophosphorylation supports the hypothesis that signal transduction of the light response occurs through phosphorylation. Most likely, autophosphorylation occurs at a conserved histidine residue, followed by a transphosphorylation to an aspartate residue in the C-terminally located response-regulator domain. This dynamic phosphorylation might be the reason for the observed weak kinase activity in vitro.

Deletion of *fphA* from the *A. nidulans* genome led to partial derepression of sexual development under red-light conditions (670 nm). This phenotype was only detectable in *veA* wild-type strains (data not shown). The *veA* gene has long been related to the light response in *A. nidulans* [15]. *veA* mutant strains predominantly develop asexually, independent of the light conditions. Deletion of the gene caused completely asexual strains [16]. Because overexpression of *veA* results in an activation of the sexual cycle and even an induction of sexual development in liquid culture, it appears to be an activator. At the same time, it seems to repress asexual development. Sequence analysis, however, did not reveal any evidence for a light-sensing role or DNA binding capacity. Therefore, it could well be that the gene is not directly involved in light sensing but acts as a regulator of sexual development. If the *fphA* mutation was analyzed in a *veA1* mutant background, no derepression of sexual development was observed (data not shown). This could be due to the largely reduced sexual cycle in the *veA1* background and suggests that VeA acts downstream of FphA or that VeA and FphA operate in parallel developmental pathways.

Another question is where light perception occurs. In

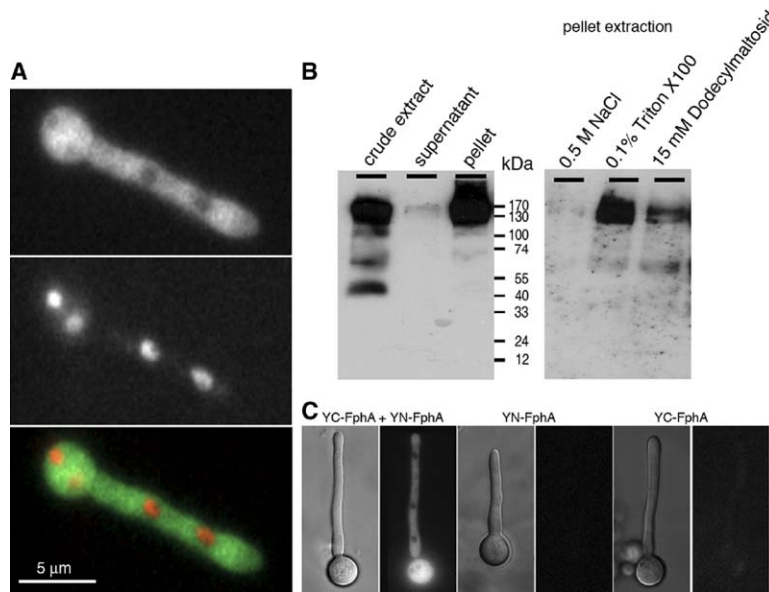


Figure 4. Localization of FphA

(A) The *fphA* open reading frame was fused to GFP and coexpressed with nuclear-targeted DsRedT4 in germlings of *A. nidulans*. The following are shown: on top, GFP fluorescence; at middle, DsRed fluorescence; and on bottom, overlay and colorization of the picture.

(B) Cell fractionation and detection of FphA::HA by western blotting. Crude extract was centrifuged at  $100,000 \times g$  for 1 hr, and the pellet was resuspended in buffer (left blot) or in buffer containing 0.5 M NaCl, 0.1% Triton X100, or 15 mM Dodecylmaltosid. Twenty micrograms of protein were loaded into each lane.

(C) BiFC analysis of FphA. FphA was N-terminally fused with the C-terminal or the N-terminal half of YFP and transformed individually (middle and right panels) or together into *A. nidulans*. Phase contrast and fluorescence pictures are shown.

the case of WC-1 in *N. crassa*, the light receptor is a nuclear flavo protein [9–11]. We detected FphA as a GFP-fusion protein in *A. nidulans* in the cytoplasm—excluded from nuclei—and have yet no evidence for a shuttling between the cytoplasm and the nucleus (data not shown). This result seems to contrast the cell fractionation experiments, where FphA was pelleted at  $100,000 \times g$ . However, this could be explained if FphA forms a large protein complex. Likewise, it was shown in plants that phytochrome associates with electron-dense particles [17]. This was also the case for plant phytochrome expressed in yeast [18]. Considering these data, we hypothesize a signaling cascade transmitting the primary light-perception signal from the cytoplasm to the nucleus, where the phytochrome response causes a repression of sexual-development-specific genes.

Genome analysis of *N. crassa* and *A. nidulans* revealed that both fungi possess components of several light-sensing systems. The *N. crassa* genome even encodes two phytochrome-like (Phy-1, Phy-2) and one bacteriorhodopsin-like protein (Nop-1) in addition to the proteins for blue-light perception [19, 20]. However, no red-light response has been described in this fungus yet, and deletion of the two phytochromes or the *nop-1* gene did not cause any phenotypic alteration [20] (J. Dunlap, personal communication). Similarly, deletion of a phytochrome did not change light sensitivity of *Cryptococcus neoformans*, but deletion of the WC-homologs did [21]. Likewise, *A. nidulans* contains orthologs of WC-1 and WC-2, although development is regulated by red light. A blue-light response (436 nm) was only reported in a certain *A. nidulans* mutant strain (*bliA1*) [22, 23]. Our results suggest another red-light sensor system in addition to phytochrome because depression of sexual development in the *fphA* mutant did not result in the same number of cleistothecia as in the dark. The nature of this system remains to be discovered because—unlike the situation in *N. crassa*—*A. nidulans* only contains one phytochrome gene in the

genome. The presence of a variety of different light-sensing systems in several, perhaps all, fungi suggests a robust nature of this adaptive environmental response. To detect the functions and cellular responses of the different sensor systems is obviously not always easy under laboratory conditions. It remains to be determined how the different light-sensing systems process the light signal into developmental and physiological decisions to adapt optimally to changing environmental conditions and how they interact. The fact that deletion of *fphA* causes an easily visible developmental phenotype and the amenability of this organism to genetic, molecular, and cell biological methods open a door for detailed structure-function analyses and a further understanding of the signaling cascades related to phytochromes. This may also help to get further insights into the function of phytochromes in plants.

## Conclusions

We conclude that the *A. nidulans* phytochrome FphA acts as a potential red-light sensor and represses sexual development under red-light conditions. Red-light perception probably occurs in the cytoplasm.

## Supplemental Data

Supplemental Data include Experimental Procedures and are available with this article online at: <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/15/20/1833/DC1/>.

## Acknowledgments

We thank R. Weber and H. Hassel (Marburg, Germany) for preparing SEM pictures. Thanks are also due to J.C. Lagarias and A. Fischer (University of California at Davis) for the gift of pAT-BV and H.J. Wermut and R. Schwemlein (University of Karlsruhe, Germany) for the construction of a LED illumination unit. We are grateful to B. Horwitz (Haifa, Israel) for helpful discussions and to N. Requena (University of Tübingen, Germany) and J.C. Lagarias for critically reviewing the manuscript. The work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), the Fonds der Chemischen Industrie, the Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiol-

ogy, and the special program "Lebensmittel und Gesundheit" from the ministry of Baden-Württemberg. N.F.-D. is a fellow of the Emmy-Noether program of the DFG.

Received: July 12, 2005

Revised: August 16, 2005

Accepted: August 17, 2005

Published: October 25, 2005

## References

- Smith, H. (2000). Phytochromes—the enigma solved? *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 445–447.
- Kehoe, D.M., and Grossman, A.R. (1996). Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273, 1409–1412.
- Yeh, K.-C., Wu, S.-H., Murphy, J.T., and Lagarias, J.C. (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* 277, 1505–1508.
- Mooney, J.L., and Yager, L.N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* 4, 1473–1482.
- Karniol, B., Wagner, J.R., Walker, J.M., and Vierstra, R.D. (2005). Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem. J.*, in press. Published online July 8, 2005. [10.1042/BJ20050826](https://doi.org/10.1042/BJ20050826).
- Montgomery, B.L., and Lagarias, J.C. (2002). Phytochrome ancestry: Sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci.* 7, 357–366.
- Gambetta, G.A., and Lagarias, J.C. (2001). Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10566–10571.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* 9, 789–798.
- Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2002). White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297, 815–819.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297, 840–843.
- Schwerdtfeger, C., and Linden, H. (2000). Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 267, 414–421.
- Pendrak, M.L., Chao, M.P., Yan, S.S., and Roberts, E.D. (2004). Heme oxygenase in *Candida albicans* is regulated by hemoglobin and is necessary for metabolism of exogenous heme and hemoglobin to  $\alpha$ -biliverdin. *J. Biol. Chem.* 279, 3426–3433.
- Wilks, A. (2002). Heme oxygenase: Evolution, structure, and mechanism. *Antioxid. Redox Signal* 4, 603–614.
- Skaar, E.P., Gaspar, A.H., and Schneewind, O. (2004). IsdG and IsdI, heme degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 279, 436–443.
- Käfer, E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19, 33–131.
- Kim, H.-S., Han, K.-Y., Kim, K.-J., Han, D.-M., Jahng, K.-Y., and Chae, K.-S. (2002). The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 37, 72–80.
- McCurdy, D.W., and Pratt, L.H. (1986). Immunogold electron microscopy of phytochrome in *Avena*: Identification of intracellular sites responsible for phytochrome sequestering and enhanced pelletability. *J. Cell Biol.* 103, 2541–2550.
- Kunkel, T., Speth, V., Buche, C., and Schäfer, E. (1995). In vivo characterization of phytochrome-phytylcyanobilin adducts in yeast. *J. Biol. Chem.* 270, 20193–20200.
- Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., et al. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 1–108.
- Bieszke, J.A., Braun, E.L., Bean, L.E., Kang, S., Natvig, D.O., and Borkovich, K.A. (1999). The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8034–8039.
- Idnurm, A., and Heitman, J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol.* 3, 615–626.
- Champe, S.P., Nagle, D.L., and Yager, L.N. (1994). Sexual sporulation. In *Aspergillus: 50 Years on, Progress in Industrial Microbiology*, Volume 29, S.D. Martinelli and J.R. Kinghorn, eds. (Amsterdam: Elsevier Science), pp. 429–454.
- Yager, L.N., Lee, H.O., Nagle, D.L., and Zimmermann, J.E. (1998). Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 149, 1777–1786.

## Accession Numbers

The Genbank accession number for the *A. nidulans fphA* sequence reported in this paper is AJ867583.

## Note Added in Proof

The data referred to as "J. Dunlap, personal communication" are currently in press (Froehlich, A.C., Noh, B., Vierstra, R., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2005). Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, in press).



# The *Aspergillus nidulans* Phytochrome FphA Represses Sexual Development in Red Light

Anne Blumenstein, Kay Vienken, Ronja Tasler,  
Janina Purschwitz, Daniel Veith,  
Nicole Frankenberg-Dinkel, and Reinhard Fischer

## Experimental Procedures

### Strains, Plasmids, and Culture Conditions

Supplemented minimal and complete media for *A. nidulans* were prepared as described, and standard strain-construction procedures are as described [S1]. Red or far-red light conditions were obtained with LEDs from Roithner Laser Technik (Vienna, Austria) with emission maxima at 670 nm (ELD-670-524) or 740 nm (ELD-740-524), and strains were grown for 5 days at 37°C. For quantification of the number of cleistothecia, 10<sup>6</sup> conidia in 5 ml 1% top-agar were poured onto 25 ml minimal media. After 5 days at 37°C, up to 40 disks of 0.5 cm diameter from four independent cultures were collected, and cleistothecia were counted. For quantification of cleistothecia in the dark, petri dishes were wrapped with aluminium foil. Petri dishes were not sealed. The following *A. nidulans* strains were used: FGSC A4 (wild-type) and WIM126 (*pabaA1::yA2*), Fungal Genetics Stock Center, Kansas; SRF200 (*pyrG89::ΔargB::trpCΔB; pyroA4::veA1*); GR5 (*pyrG89::wA3; pyroA4*, [S2]); SAB1, SRF200 transformed with pAB11 (*pyrG89::trpCΔB; pyroA4::veA1; ΔfphA::argB*); SAB2, a cross between WIM126 and SAB1 (*ΔfphA::argB; veA1*); and SAB5, SRF200 transformed with pJW18 and pAB16 (*pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4::veA1; alcA(p)::DsRedT4::stuA; argB; alcA::fphA::sGFP; argB*). Standard laboratory *Escherichia coli* strains [XL-1 blue, Top 10 F<sup>+</sup>, BL21 (λDE3)] were used. The following plasmids were used: pAB11 (*ΔfphA::argB* in pCR2.1-TOPO) and PCR of the 5'-flanking region and of the 3'-flanking region with cDNA as template and primers, some of which with a SfiI restriction site added. These primers are as follows: FphA5-for 5'-GCCTCT GCTTACTAATCAGATA-3' and FphA5Sfi-for 5'-GGCCATCTAGG CCGCTAGTCGTGAGAGTACGTAGGA-3'; FphA3Sfi-for 5'-GGCCTG AGTGGCCTTGTGTTGGCATGAATTTACGC-3' and FphA3-rev 5'-TCA AACAGACCAAGATGGCA-3'; pAB16 (*alcA::fphA::sGFP, argB*) and pAB14 (*alcA::fphA::HA, argB*). *fphA* was amplified with the primers GateFphA5-for 5'-CACCATGTCCGAGCTCCCTCTC-3' and Gate-FphA3-rev 5'-CGAATGCGTGTACGGTGTG-3', cloned into the vector pENTR (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), and recombined into the destination-vector pMT-sGFP [S3]. *E. coli* expression plasmid pASK-*fphA* (PCR with primers 5'-GGGTACCTCCGAGCTCCCTCTCTCG-3' (fwd) and 5'-CATGCCATGGGCACCGGTACGCGTAGAA TCG-3' (rev) with pAB22 as template cloned KpnI, NdeI into pASK-IBA3). Site-directed mutant C195A was constructed with the site-directed mutagenesis kit (Stratagene) with primer 5'-CGTTGACTCT TTCAAAGCCGCCGAAGACGAGC-3' (fwd); the second primer was the complement. pAT-BV is derived from pAT-103 [S4] by removal of the *pcyA* gene (A. Fischer and J.C. Lagarias, personal communication). Plasmid pMBC-apx17 is an *A. nidulans* expression plasmid containing the *alcA* promoter, GFP2-5, and *pyr4* as selective marker [S5]. For N-terminal tagging of *fphA* with GFP2-5, *fphA* was amplified with the primers AscI FphA 5'-GGCGCGCCTATGTCCGAGCTC CCCCTC-3' and PacI FphA 5'-GTTAATTAAGGCGACTCCCGAGAT GGC GC-3' and subcloned into pMBC-apx17 with AscI/PacI as restriction sites generating plasmid pJP2. For N-terminal tagging of *fphA* with the halves of YFP, eYFP from Clontech was PCR amplified with primers 5'-CGGTACCATGGTGTGAGCAAGGCGGAGGAGCTG-3' and 5'-CGGCGCGCCCGTGGCGATGGAGCGCATGATATAGACGTTG TGGCTGTTGTAG-3' for the eYFP N terminus (YN) and primers 5'-CGGTACCATGGCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGG-3' and 5'-CGGCGCGCCCGTGGTTCATGACCTCTGTTCAGGTCGTTT GGGATCTTGACAGGCCGGCGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA GAGTGATCCC-3' for the eYFP C terminus (YC). These primers introduced a KpnI and an AscI restriction site in addition to protein linker sequences "RSIAT" (YN) and "RPACKIPNDLKQKVMNH" (YC). The eYFP was split at position 460–462 bp, with the ATG as start codon

for the YC half. PCR fragments were subcloned into pCR2.1-Topo (Invitrogen, Karlsruhe), producing plasmids pDV5 (YN) and pDV6 (YC). YN and YC were released with KpnI and AscI and used to replace GFP2-5 in pJP2 and produce plasmids pJP4 (YN-FphA) and pJP5 (YC-FphA).

### Deletion and Tagging of *fphA*

*fphA*-flanking regions (1 kb) were cloned upstream and downstream of the *argB* marker (pAB11). The deletion construct was amplified with primers of the flanking regions and the linear PCR fragment transformed into the arginine-auxotrophic *A. nidulans* strain SRF200. Among 60 transformants, four double recombinants were identified by PCR and further confirmed by Southern blot. None of them had additional integrations. One *ΔfphA* strain (SAB1) was crossed to WIM126 and a *veA*<sup>+</sup>, *ΔfphA* strain selected (SAB2). Linkage of the deletion event and the *ΔfphA* phenotype was shown by Southern blot of 12 strains. To create a C-terminal fusion of FphA, we PCR-amplified the open reading frame and fused it to sGFP or HA with the GATEway cloning system [S3]. The construct pAB16 was cotransformed with pJW18 (nuclear stain) into SRF200. For N-terminal tagging with GFP and split YFP domains, plasmids pJP2, pJP5, and pJP6 were introduced into GR5. For HA-tagging, pAB14 was introduced into SRF200, and the strain was grown in liquid medium, mycelium harvested, and ground in liquid nitrogen. The powder was suspended in Tris-EDTA-buffer (pH 8) containing protease inhibitors. The slurry was centrifuged for 20 min at 27,000 × g, and this crude extract was further processed for 100,000 × g centrifugation. Western blotting was done according to standard procedures.

### Expression, Purification, Spectroscopy, and Kinase Activity of FphA

*E. coli* BL 21 (λDE3) containing pASK-*fphA* together with pAT-BV (kind gift of Dr. J.C. Lagarias, University of California at Davis) were grown in Luria-Bertani medium containing 50 μg/ml ampicillin and 25 μg/ml kanamycin. Protein expression was induced with anhydrotetracycline (0.2 μg/ml) and IPTG (100 μM), and cells were grown for further 3 hr at 25°C. Purification was done as described before [S6]. Purified FphA was subjected to red/far-red light-induced difference spectroscopy as described before with interference filters at 630 nm and 750 nm with 20 nm band width [S7]. Zinc blots and histidine kinase assays were done according to published procedures [S8, S9].

### Fluorescence Microscopy

For live-cell imaging, cells were grown in glass-bottom dishes (World Precision Instruments, Berlin) in 2 ml of medium, either MM + 2% glycerol + pyridoxine and/or uracil and uridine. Cells were incubated at 30°C for 10 hr, and images were captured at room temperature with an Axiophot microscope (Zeiss, Jena, Germany), a Planapochromatic 63× or 100× oil immersion objective lens, and a 50 W Hg lamp. Fluorescence was observed with standard GFP, YFP, and DsRed filter sets. Images were collected and analyzed with a Hamamatsu Orca ER II camera system and the Wasabi software (version 1.2) and Adobe Photoshop.

### Alignment and Phylogenetic Analysis

Multiple sequence alignments and phylogenetic tree analysis were performed with the Lasergene Software package v. 6 (DNASTAR, Madison, Wisconsin) and the ClustalW method.

## Supplemental References

- S1. Hill, T.W., and Käfer, E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: Trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genet. Newsl.* 48, 20–21.
- S2. Waring, R.B., May, G.S., and Morris, N.R. (1989). Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin coding genes. *Gene* 79, 119–130.
- S3. Toews, M.W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P.E., Veith, D., Vienken, K., Vinuesa, C., Wei, H., and Fischer, R. (2004). Establishment of mRFP1 as fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination in *Escherichia coli* (GATEWAY). *Curr. Genet.* 45, 383–389.
- S4. Tooley, A.J., Cai, Y.A., and Glazer, A.N. (2001). Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoyanin holo- $\alpha$  subunit in a heterologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10560–10565.
- S5. Veith, D., Scherr, N., Efimov, V.P., and Fischer, R. (2005). Role of the spindle-pole body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Sci.*, in press.
- S6. Tasler, R., Moises, T., and Frankenberg-Dinkel, N. (2005). Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J.* 272, 1927–1936.
- S7. Terry, M.J., and Lagarias, J.C. (1991). Holophytochrome assembly. Coupled assay for phytochromobilin synthase in organello. *J. Biol. Chem.* 266, 22215–22221.
- S8. Berkelman, T.R., and Lagarias, J.C. (1986). Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 156, 194–201.
- S9. Yeh, K.-C., Wu, S.-H., Murphy, J.T., and Lagarias, J.C. (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* 277, 1505–1508.



## **Danksagung**

Mein Dank gilt vor allem Frau PD Dr. Frankenberg-Dinkel für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und für ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Für die freundliche Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn.

Großer Dank gilt der gesamten AG Frankenberg für das sehr gute Arbeitsklima und die inspirierende Atmosphäre. Ganz herzlich bedanke ich mich bei Maria Sowa für die Hilfe bei den Proteinreinigungen.

Dr. Jürgen Mooser danke ich für die stets hilfreiche Unterstützung bei auftretenden Problemen.

Auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jahn bedanke ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei Simone Virus, Heike Reents und Corinna Lürer für ihre große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonders danke ich meiner Familie und allen Freunden für ihre Unterstützung und ihr Verständnis während meiner Promotionszeit.